

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE
HUMAINE ET EXPERIMENTALE

ANNEE 1970 - 1971

SERIE U.N°491

THESE

PRESENTEE

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

MENTION PHARMACIE

PAR

Moïse AZRIA

TITRE

ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE DES PREPARATIONS
PHARMACEUTIQUES APPLIQUEE AUX SIROPS

Soutenue le 17 Fevrier 1971

JURY :	Melle LAMBIN,	<i>Président</i>
	M. DESVIGNES,	<i>Examinateur</i>
	M. KIGER,	<i>Examinateur</i>

UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DE BIOLOGIE
HUMAINE ET EXPERIMENTALE

ANNEE 1970 - 1971

SERIE U.N°491

THESE

PRESENTEE

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE RENE DESCARTES DE PARIS

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

MENTION PHARMACIE

PAR

Moïse AZRIA

TITRE

ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE DES PREPARATIONS
PHARMACEUTIQUES APPLIQUEE AUX SIROPS

Soutenue le 17 Fevrier 1971

JURY :	Melle LAMBIN,	<i>Président</i>
	M. DESVIGNES,	<i>Examinateur</i>
	M. KIGER,	<i>Examinateur</i>

THÈSE

PRÉSENTÉE

A L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DE BIOLOGIE HUMAINE ET EXPERIMENTALE
DE L'UNIVERSITE REALE D'AMSTERDAM

PAR L'ÉTUDIANT

BOETIUS DE L'UNIVERSITE

DE L'UNIVERSITE REALE D'AMSTERDAM

PAR

M. de L'UNIVERSITE

1952



ETUDE DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE DES PREPARATIONS

PHARMACEUTIQUES APPLIQUEES AUX ENFANTS

Présentée à la Faculté de Médecine

Président : M. de L'UNIVERSITE
Rapporteur : M. de L'UNIVERSITE
Examinateur : M. de L'UNIVERSITE

A Mademoiselle L A M B I N

*Professeur à l'U.E.R. de Biologie humaine et expérimentale
de Paris.*

Nous la remercions très vivement de l'intérêt qu'elle
nous a manifesté et d'avoir bien voulu accepter de
présider notre Jury de Thèse.

Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de notre
respectueuse gratitude.

A Monsieur D E S V I G N E S

*Professeur à l'U.E.R. de Biologie humaine et expérimentale
de Paris.*

Qui nous a confié le sujet de ce travail. Nous avons
pu apprécier, au cours de nos études, ses qualités
d'enseignant et durant nos travaux de recherches sa
rigueur scientifique.

Qu'il veuille trouver ici le témoignage de notre res-
pectueuse admiration et de notre vive reconnaissance.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543720_0050

A notre Maître Monsieur K I G E R

Professeur Agrégé du Val de Grâce

Par ses qualités humaines et scientifiques, il a su sans cesse guider avec efficacité nos efforts dans le développement du sujet qui nous a été confié.

Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre respectueuse admiration et de notre vive reconnaissance.

A Monsieur C H A T A I N

Directeur - Gérant des Laboratoires SANDOZ

Dont la bienveillante compréhension nous a
considérablement aidés pour la réalisation
de ces travaux de recherche.

En témoignage de notre profonde reconnais-
sance et de notre entier dévouement.

Meis et Amicis

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA POLLUTION MICROBIENNE DES MEDICAMENTS

I - <u>Incidences pathologiques de la contamination microbienne</u>	3
II - <u>Influence sur la stabilité des médicaments</u>	6
III - <u>Facteurs essentiels de contamination</u> :	8
1°) Matières premières	8
2°) Cas particulier de l'eau	9
3°) Cas particulier du sucre	10
4°) Conditions de fabrication :	12
a - Personnel	12
b - Locaux de travail et de stockage	14
c - Matériel de fabrication	15
d - Manipulation des matières premières	16
e - Formulation et procédés de fabrication	16
IV - <u>Facteurs modifiant le développement de la contamination</u>	17
1°) Matières premières	17
2°) Conditionnement	19
3°) Température	22
4°) pH	24
5°) Pression osmotique	25
6°) Conservateurs	28
7°) Adaptation des germes aux conditions défavorables de développement	29
8°) Mode de préparation	30
V - <u>Germes décelés par divers auteurs lors d'études antérieures et normes ou propositions déjà existantes</u>	31
1°) Germes décelés lors d'études antérieures	31
2°) Normes ou propositions déjà existantes	37

CHAPITRE 2 : RECHERCHES PERSONNELLES

I - <u>Sirops pharmaceutiques commercialisés en France, objets de l'étude</u>	41
1°) Définition	41
2°) Classification selon les indications thérapeutiques et par catégories d'utilisateurs	43
3°) Classification en fonction des conservateurs et produits apparentés utilisés	45
II - <u>Méthodologie</u>	50
1°) Paramètres influant sur les techniques	50
a - Importance de l'échantillonnage par rapport au lot à analyser	50
b - Préincubation des échantillons à analyser	50
c - Composition du liquide de dilution ou de dispersion	51
d - Durée de séjour dans le liquide de dilution ou de dispersion	53
e - Agitation	54
f - Technique d'ensemencement proprement dite	54
g - Composition du liquide de rinçage	55
h - Milieux de culture	55
i - Températures et durées d'incubation	56
2°) Conditions opératoires adoptées	58
a - Principes généraux	58
b - Liquide de dilution et de rinçage	58
c - Matériel de filtration	59
d - Mode opératoire	60
e - Matériel de culture	60
f - Matériel de numération	61
3°) Isolement et numération des cinq groupes de germes essentiels	61
a - Germes aérobies totaux	63
b - Germes anaérobies totaux	64
c - Champignons microscopiques totaux	64
d - Entérobactériacées	65
e - Pseudomonadacées	68

4°) Identification d'espèces particulières	69
a - Staphylocoques pathogènes	69
b - Streptocoques fécaux	77
c - Germes sulfito-réducteurs	78
d - Différenciation des Entérobactériacées	80
e - Différenciation des Pseudomonadacées :	
- identification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
III - <u>Résultats obtenus</u>	85
1°) Considérations générales	85
a - Importance des prises d'essai et nombre d'analyses effectuées	85
b - Expression des résultats	87
2°) Compte rendu des résultats	88
a - Tableaux généraux	88
b - Tableaux détaillés	88
c - Courbes	89
IV - <u>Interprétation des résultats et suggestions</u>	114
1°) Considérations générales	114
2°) Interprétation des résultats par groupes de germes	115
3°) Espèces particulières	116
4°) Interprétation des résultats en fonction du pH des sirops ...	118
5°) Efficacité des principaux conservateurs et produits apparentés annoncés	119
6°) Modèle d'enquête microbiologique	138
CONCLUSIONS	147
BIBLIOGRAPHIE	151

I N T R O D U C T I O N

I N T R O D U C T I O N

"*Primum non nocere*", telle est la traditionnelle règle d'or de l'art pharmaceutique.

C'est dans cette optique que le problème de la contamination des spécialités pharmaceutiques non stériles préoccupe de plus en plus, depuis quelques années, les responsables en ce domaine.

En effet, une pollution quantitativement élevée et qualitativement pathogène peut avoir de graves conséquences, tant en ce qui concerne l'innocuité que la stabilité du médicament.

Ce problème est aujourd'hui plus que jamais d'actualité et de nombreuses publications s'y rapportent depuis les deux événements qui attirèrent l'attention des responsables :

En janvier 1963, à la suite d'une *poussée de Salmonellose* observée parmi le personnel d'une pharmacie suédoise, toute une série de médicaments fut examinée par le Laboratoire National de Bactériologie de Stockholm : les résultats montrèrent alors une forte contamination de plusieurs médicaments, qui renfermaient, dans certains cas, jusqu'à quelques millions de germes au gramme.

Au printemps 1964, en Suède également, *des infections oculaires graves*, allant jusqu'à la perte de la vue, furent constatées : elles étaient dues à l'emploi d'une pommade ophtalmique dans des lésions cornéennes après extirpation de corps étrangers : cette pommade était contaminée par *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces deux incidents furent à l'origine de l'enquête microbiologique consignée dans un Rapport soumis en 1965 au *Conseil National Suédois de la Santé*. Ce fut le point de départ de l'étude approfondie de cette question par les organismes officiels de nombreux pays : (pays nordiques, Grande-Bretagne, U.S.A., Tchécoslovaquie, ...)

Ce sujet, resté en apparence ignoré pendant de fort nombreuses années, suscite aujourd'hui beaucoup d'intérêt pour deux raisons essentielles : *l'innocuité des médicaments* dispensés aux malades et *leur stabilité*. Ceci fait partie du développement inexorable d'un processus de notre orientation actuelle : *"rechercher la meilleure qualité possible des médicaments administrés aux malades"*.

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA POLLUTION MICROBIENNE DES MEDICAMENTS

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA POLLUTION MICROBIENNE

I - INCIDENCES PATHOLOGIQUES DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE

C'est malheureusement, comme nous venons de l'évoquer, à la suite d'accidents spectaculaires, que depuis 1964 dans le monde entier, de nombreux laboratoires de la Santé Publique et de l'Industrie privée se sont penchés sur ce problème.

En Suède, ainsi que dans d'autres pays, divers incidents pathologiques furent relevés ; en voici quelques cas :

- Des crèmes désinfectantes pour les mains, utilisées dans un hôpital, surinfectèrent les malades (1) (88). Ceci était dû à la présence de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Divers médicaments contenant de la pancréatine (57), de la teinture de cochenille (10) (75) ou de l'amidon de pomme de terre (61), furent incriminés comme responsables de certaines gastro-entérites. Ces composants étaient souillés par divers germes (*Salmonelles*, *Pseudomonas*, *Coliformes*).
- En 1966, en Suède, plus de 200 personnes furent atteintes de Salmonellose après avoir absorbé des comprimés à base de poudre de thyroïde fortement contaminée par des Salmonelles (111) (60).
- Certains produits de décomposition, engendrés par la présence de contaminants non pathogènes (tel le *bacille Proteus*), provoquèrent des irritations intestinales, qui favorisèrent l'action d'agents pathogènes (111).
- En Grande-Bretagne, l'utilisation de collyres provoqua des infections dues à *Pseudomonas aeruginosa* chez 15 sujets (5).
- En 1966, MITCHELL & HAYWARD signalèrent sept cas d'infection du tractus urinaire après cystoscopie : la solution de chlorhexidine utilisée contenait des *Pseudomonas* (83).
- La même année, des poussées d'infection à Salmonelles (*Salmonella cubana*) observées en milieu hospitalier aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne, furent causées par l'administration de capsules de carmin contaminées par ces micro-organismes (10).

- Des staphylocoques présents dans des laits médicamenteux et retrouvés dans les selles, provoquèrent des entérites chez les nourrissons ayant pris ces remèdes (82).
- Dans une pommade à base de stéroïdes et renfermant du chlorocrésol, il fut décelé la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de maladies épidémiques : la présence du chlorocrésol à la concentration adoptée n'était pas suffisante pour inhiber le développement de ce germe (8).
- Enfin, on isola d'un lait acidifié une souche de *Klebsiella pneumoniae* particulièrement pathogène pour la souris (82).

Cette liste est loin d'être complète, mais tous ces exemples relevés dans la littérature nous amènent à considérer l'aspect clinique de la question.

o o c o o o c

Les manifestations cliniques chez les patients dépendent de plusieurs facteurs, dont les principaux sont :

- le pouvoir pathogène et le nombre des germes présents dans le médicament souillé,
- l'état physio-pathologique des patients,
- la voie d'administration des médicaments souillés.

Il est connu que le pouvoir pathogène d'un micro-organisme non toxigène est fonction de sa virulence, c'est-à-dire de sa faculté de proliférer dans l'organisme et d'y provoquer des états pathologiques. En outre, plus le nombre de micro-organismes est élevé, plus l'infection a des chances de se développer ; mais même un petit nombre de germes peut agir : ainsi, 15 staphylocoques ont pu provoquer des symptômes infectieux intestinaux (108). Des micro-organismes peuvent également se développer pendant un certain temps à l'abri des réactions de défense de l'organisme (par exemple, dans les follicules pileux), puis provoquer une infection massive après avoir proliféré. Injectées à des animaux, diverses substances semblent aussi accroître le pouvoir pathogène des micro-organismes qui les accompagnent : c'est le cas, par exemple, de la lanoline (69).

Les phénomènes inflammatoires ou certaines maladies comme le diabète ou la leucémie, interfèrent avec les mécanismes normaux de défense.

Enfin, *aucune voie d'administration ne semble dépourvue de danger* : des aiguilles et cathéters cardiaques, conservés dans des solutions antiseptiques contaminées, ont provoqué des septicémies ; des cathéters endotrachéaux, enduits de pommade à la lignocaïne contaminée, ont causé des infections pulmonaires (92).

Parmi tous les germes possibles, deux méritent une plus grande attention : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

a) *Staphylococcus aureus*

Ce germe est largement répandu chez l'homme : on le rencontre dans le contenu intestinal, sur la peau, dans la salive et sur la muqueuse nasale. C'est l'agent causal de l'impétigo, des furoncles, des anthrax et de troubles gastro-intestinaux dus à la production d'entérotoxine staphylococcique quand les conditions sont propices à la sécrétion de cette toxine (présence dans le milieu de produits nutritifs, opothérapiques, dérivés du lait, vitamines, acides aminés et sucres).

Le syndrome le plus fréquent de l'intoxication consiste en nausées, vomissements, diarrhées, crampes abdominales, parfois même traces de sang apparaissant dans les selles et vomissements (22). La présence de ce germe dans l'eau comme dans l'air peut entraîner une contamination des préparations pharmaceutiques.

b) *Pseudomonas aeruginosa*

Depuis l'apparition des antibiotiques, ce germe joue un rôle important dans les infections humaines (13) (129). Il est résistant à la plupart des antibiotiques et peut survivre et se multiplier en dehors du corps humain. Dans les enquêtes épidémiologiques, on le rencontre dans les évacuations de salles de bain, les porte-savons et les solutions désinfectantes. RINGEN & Coll. l'ont trouvé en grande quantité dans les eaux d'égoûts (97) et SCHOOTER & Coll. dans les fèces d'un petit nombre de personnes en bonne santé (117).

L'hospitalisation favorise la contamination par ce germe, qui peut se faire également de personne à personne. *Pseudomonas aeruginosa* n'est présent que transitoirement chez un sujet sain, ce qui n'est pas le cas chez un malade (52) : par exemple, la microflore d'une oreille cliniquement saine n'est pas pathogène, mais le germe ci-dessus est souvent isolé dans le cas d'otites externes (107), ce qui ne signifie pas nécessairement que ce micro-organisme soit l'agent pathogène. Mais lorsque la résistance du malade est diminuée, *Pseudomonas aeruginosa* peut provoquer des troubles plus ou moins graves.

Une variété de lésions semble être caractéristique des septicémies à *Pseudomonas* (49) : un grand nombre de ces micro-organismes se rencontre dans les parois de petites artères (50), ce qui semble indiquer qu'ils y ont été amenés par le torrent sanguin. La même image histologique peut être vue après injection sous cutanée de ces mêmes germes à des animaux réceptifs.

o o o o o o o

Toutes ces considérations montrent que la présence de certains micro-organismes dans des préparations pharmaceutiques peut provoquer des troubles très graves, surtout lorsque ces germes y sont présents en grand nombre.

II - INFLUENCE SUR LA STABILITE DES MEDICAMENTS

Une éventuelle contamination microbienne peut modifier la composition des formes pharmaceutiques en les altérant : goût, odeur, aspect, voiles mycéliens, troubles, dépôts, précipitations, coloration par production de pigments, décoloration, modification du pH, d'où hydrolyse possible de certains principes actifs (alcaloïdes, glucosides...)

Plusieurs cas ont été signalés dans la littérature, dont voici quelques exemples :

- le plus connu est celui des préparations à base de pénicilline, qui perdent de leur titre si certains micro-organismes présents secrètent une pénicillinase,

- *Proteus vulgaris* peut provoquer la dégradation de diverses molécules telles qu'antibiotiques (pénicilline) et colorants (tartrazine) (110),
- les germes fécaux sont capables de transformer le lanatoside A en digitoxine (110).

Les préparations pharmaceutiques contenant des conservateurs et fortement souillées au départ peuvent voir les germes qu'elles renferment se développer, infecter le milieu ou tout simplement provoquer des dégradations par suite de la disparition ou de la diminution de la concentration active de ces conservateurs : [minimum inhibitory concentration ou *concentration minimale d'inhibition*] .

Enfin, les moisissures qui se développent donnent souvent un aspect peu engageant aux préparations pharmaceutiques. La majorité de ces altérations de la stabilité est due essentiellement à l'activité biochimique des bactéries et des fungi. En effet, le métabolisme des micro-organismes résulte d'un rapide et profond changement de l'environnement chimique (18) au cours du renouvellement du protoplasme, des réactions chimiques complexes et nombreuses se produisant dans une période remarquablement courte. Les principales réactions possibles dues aux enzymes secrétées sont les suivantes: hydrolyse, déshydratation, oxydation, réduction, décarboxylation, désamination, phosphorylation, déphosphorylation,... Il en résulte une accumulation de produits résiduels très variés, d'où modifications du milieu parfois importantes.

Par ailleurs, les bactéries peuvent utiliser différentes voies métaboliques, *en fonction des conditions du milieu* où elles se trouvent. H.S. BEAN & Coll. signalent le cas d'*Aerobacter aerogenes*, qui attaque l'acide pyruvique en donnant à pH 8 les acides formique et acétique, tandis qu'à pH 6 l'acide pyruvique est simplement décarboxylé. (18)

L'orientation des recherches en vue de l'isolement, de dénombrement et de l'identification des micro-organismes éventuels contaminant les préparations pharmaceutiques est conditionnée par divers éléments, dont les trois principaux sont les suivants :

- *facteurs essentiels de la contamination,*
- *facteurs modifiant le développement de la contamination,*
- *germes déjà trouvés lors des études antérieures et normes ou propositions déjà existantes.*

o o o o o o o

III - FACTEURS ESSENTIELS DE CONTAMINATION

Ils sont multiples :

1°) Matières premières

Celles-ci peuvent être des agents importants de contamination, par exemple :

- *Produits fortement pollués à l'origine, tels extraits de plantes, produits opothérapiques,...*
- *Produits contenant : poussières, insectes,...*
- *Produits naturels, (kaolin, talc, craie, amidon), pouvant contenir des bactéries ou des fungi. Les gommes naturelles (tragacantha, karaya, acacia,...) sont toujours très fortement contaminées (18),*
- *Produits mal emballés, (emballage unique sans double enveloppe,...*
- *Produits mal stockés.*

Les *produits synthétiques* bien conditionnés après un processus de fabrication rationnel sont en général relativement peu contaminés.

Au départ donc, *les matières premières doivent être aussi peu souillées que possible* et ne pas contenir trop de germes morts (risque pyrogène). A leur réception, elles doivent subir une analyse microbiologique rigoureuse. Un contrôle sur échantillons peut d'ailleurs être pratiqué avant achat. Il est même possible d'exiger pour certaines matières premières leur stérilisation (à l'oxyde d'éthylène, par irradiation, ...)

Les prélèvements des échantillons de matières premières pour analyses (63) peuvent poser des problèmes de contamination. Il est indispensable d'utiliser un matériel de prélèvement stérile, en prenant soin d'obturer les ouvertures faites à la suite de ces opérations sur chaque contenant.

2°) Cas particulier de l'eau

Cette matière première constitue la base essentielle des préparations pharmaceutiques liquides.

- L'eau potable contient toujours des micro-organismes, mais dans des limites acceptables, à condition de maintenir les installations propres et de procéder à des désinfections périodiques aux points critiques (joints, points morts, robinetterie, ...)
- L'eau déminéralisée, très souvent souillée, est l'un des *contaminants essentiels* : ceci est dû à la stagnation de l'eau au contact des résines, elles-mêmes souvent polluées.

Il est donc indispensable pour les circuits d'eau déminéralisée de prévoir un système de recirculation au niveau des résines, afin d'éviter cette stagnation.

- L'eau distillée favorise également le développement microbien. Dans un rapport à la Société Américaine des Microbiologistes

en mai 1968, le Docteur G. SYKES a signalé la rapidité de croissance du groupe des Pseudomonadacées en quelques jours à 22°C dans un tel milieu (74).

Pour cette matière première donc, les récipients de stockage et les tuyauteries doivent être nettoyés régulièrement par un traitement approprié tel que :

- passage de vapeur,
- utilisation de solutions d'hypochlorite diluées, puis rinçage abondant à l'eau chaude (selon DAVIS, 150 à 200 ppm d'hypochlorite rendent propre du métal ou du verre en deux minutes),
- remplacement périodique des tuyauteries souples.

Les joints, tubulures de connexion et robinets, sources de contamination, devront être l'objet d'une attention particulière ; des contrôles seront effectués après des réparations ou simplement avant l'utilisation d'une nouvelle installation.

3°) Cas particulier du sucre

Il convient de rappeler que le sucre, matière première très utilisée dans l'Industrie pharmaceutique, principalement pour la fabrication des sirops, peut apporter son lot de micro-organismes. Il est obtenu cristallisé à partir d'un sirop que l'on concentre sous vide à 80-90°C. Ce sirop est lui-même préparé par concentration sous pression d'un jus épuré de betteraves ; cette évaporation se fait dans un appareil à multiples effets, dont le premier corps est à 120°C-125°C, et les autres à températures décroissant jusqu'à 60°C-80°C.

Le jus épuré, qui est déjà presque stérile du fait des filtrations que comporte l'épuration et de sa température élevée (90°C), est alors porté pendant plusieurs minutes à 120°C-125°C. On peut admettre qu'il est dès lors stérilisé.

Le produit à partir duquel le sucre est cristallisé étant stérile, les germes qui le polluent ne peuvent provenir que de contaminations extérieures.

BROWNE (31), de VILLERS (39), SHOREY (118), de WHALLEY et Coll.,
ont rencontré les espèces suivantes :

<u>Moisissures</u>	{	<i>Mucor racemosus</i> <i>Penicillium glaucum</i>	
<u>Levures</u>	{	<i>Monilia fusca</i> <i>Monilia nigra</i> <i>Rhodotorula Sp.</i> <i>Saccharomyces Sp.</i> <i>Schizosaccharomyces Sp.</i> <i>Torulopsis Sp.</i> <i>Zygosaccharomyces Sp.</i>	
<u>Bactéries</u>	{	<i>Aerobacter aerogenes</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus mesentericus</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus pyogenes</i> <i>Sarcina citrina</i> <i>Staphylococcus albus</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Streptococcus lactis</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Clostridium nigrificans</i> <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	} Bactéries thermorésistantes

En général, le nombre de germes contenus dans le sucre est faible, de l'ordre de quelques dizaines par gramme. Mais ce nombre initial peut augmenter considérablement sous l'influence de divers facteurs, tels que l'humidité, comme nous le verrons page 18.

4°) Conditions de fabrication

a) Personnel

Le personnel atteint de maladies infectieuses (rhinopharyngites, abcès, furoncles, dermatoses,...) peut contaminer les produits au cours de la fabrication.

Le personnel sain est également un réservoir permanent de germes banaux ou pathogènes, d'où la nécessité d'une hygiène rigoureuse.

L'hygiène des mains revêt une importance toute particulière, car c'est par des mains polluées et sans protection que se produit souvent une contamination; les mains doivent être propres, les ongles courts, brossés avec soin et régularité, sans vernis coloré, qui pourrait cacher souvent des dessous d'ongles chargés de crasse microbienne. Les bagues et bracelets doivent être interdits pendant le travail.

La disposition des lavabos doit permettre de se laver les mains juste avant de reprendre le travail ou après tout passage dans les locaux sanitaires. Les robinets ne devraient pas être ouverts manuellement, mais commandés mécaniquement au pied. Des savons liquides contenant un désinfectant (tel que l'hexachlorophène) sont conseillés de préférence aux savons solides et peuvent être contenus, par exemple, dans des distributeurs à pédales. Il est préférable de disposer de serviettes en papier et en distributeurs mécaniques. KIGER & Coll. préconisent même le principe d'une trousse individuelle personnelle, offerte par l'employeur à chacun de ses ouvriers, avec obligation de l'emporter et de l'utiliser après chaque passage dans les locaux sanitaires (65).

o o o o o o o

Le médecin du personnel devra bien connaître les problèmes particuliers de l'Industrie Pharmaceutique.

Un examen médical complet du personnel avant engagement doit être pratiqué sur celui-ci pour s'assurer de l'absence de maladies infectieuses, telles que tuberculose, sinusite chronique, infection des oreilles, eczéma infecté, plaies sur les bras, hépatite virale, ...

L'état de santé des mains doit retenir tout spécialement l'attention. De même, les personnes relevant d'une maladie infectieuse passeront alors une nouvelle visite auprès du médecin avant de réintégrer leur emploi.

o o o o o o o

*L'absence de vêtements de travail adéquats (chaussures, gants, combinaisons, couvre-chefs, masques, ...) est très néfaste pour la propreté microbiologique des produits fabriqués. En effet, les vêtements de travail mal nettoyés sont des réservoirs de germes : à titre d'exemple, KALLINGS & Coll. ont relevé la présence de *Pseudomonas aeruginosa* sur des chaussures et des gants du personnel (59) (60) (61).*

Des vestiaires individuels convenablement ventilés doivent être aménagés de façon à garder séparés les vêtements de ville de ceux de travail, de préférence dans des compartiments différents. Quant à la qualité des vêtements de travail, il y aurait encore beaucoup de progrès à effectuer, notamment dans le sens de la confection de vêtements dits antiparticules, déjà utilisés dans l'industrie électronique, et de leur lavage adéquat par des entreprises spécialisées.

o o o o o o o

Le personnel, à tous les échelons, doit en outre *apprendre ce qu'est un contaminant et dans quelles conditions les contaminations peuvent se produire*. Il devra connaître l'importance du maintien d'un haut degré de propreté pour lui comme pour la production, par un enseignement, des instructions écrites et des informations spéciales (circulaires, bulletins, affiches, projections).

Les visites des lieux de fabrication pendant le travail devraient, en principe, être interdites ou canalisées dans des couloirs vitrés séparés.

o o o o o o o

b) Locaux de travail et de stockage

Dans les magasins de stockage, l'humidité, la température et la qualité de l'air doivent être l'objet de soins attentifs, en vue d'influencer favorablement la propreté microbiologique des matières premières ou des préparations pharmaceutiques qui y sont entreposées.

Les récipients vides comme les articles de conditionnement doivent être microbiologiquement propres et subir une désinfection ou même une stérilisation, à l'oxyde d'éthylène par exemple.

Les lieux de fabrication doivent être conçus dans un esprit de recherche permanente de propreté. Les plafonds et les murs doivent être de préférence carrelés, en tout cas toujours lisses ; ces lieux doivent être faciles à nettoyer et ne doivent pas être utilisés pour un stockage quelconque, mais seulement pour un transit : l'accumulation des produits semi-manufacturés y sera interdite, ceux-ci devant être évacués aussi vite que possible dans un magasin temporaire.

Le passage du matériel et du personnel doit se faire par des sas à l'entrée du lieu de travail. Dans ces sas, l'emballage externe des matières premières doit être enlevé ou nettoyé, et de l'eau et des évacuations prévues.

Au cours de l'élaboration des plans des locaux, et par la suite, des instructions de nettoyage, il ne faudra pas oublier les mesures à envisager pour la *lutte contre les insectes et les prédateurs*, qui se développent rapidement en atmosphère humide (3 à 10 semaines) (65). Ce problème a été largement traité par KIGER & Coll. (65).

o o o o o o o

L'air d'environnement, en contact avec les matières premières dans les lieux de fabrication (ou de stockage), peut engendrer des contaminations microbiennes importantes suivant qu'il est traité ou non.

DESBORDES & Coll. (38) ont ainsi retrouvé dans l'air de Paris différents germes tels que *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, ...

La qualité de l'air des enceintes de travail doit donc respecter certaines normes précises (température, humidité), qui doivent être maintenues constantes en permanence.

Pour obtenir une *zone de confort optimal du personnel*, les normes sont en général de 20°C et 65 % d'humidité relative (65). Elles peuvent être retenues pour la fabrication, mais avec un taux d'humidité légèrement moins élevé, car trop d'eau dans l'atmosphère favorise le développement des micro-organismes.

Quant à *la filtration de l'air*, elle est capitale. Elle devra se faire de préférence sur filtre absolu, car les poussières ou particules non vivantes peuvent être des micro-organismes ou leur véhicule.

L'apparition récente sur le marché d'*enceintes à flux d'air laminaire* permet de résoudre favorablement les problèmes techniques de décontamination ; chaque fois qu'il sera possible et nécessaire, il faudra prévoir une installation générale ou des tunnels à flux d'air laminaire stérile, principalement au-dessus des fabrications. Cette technique offre de plus l'avantage d'éliminer toute poussière toxique ou allergisante qui gênerait le travail et la santé du personnel, sans compter les risques de pollution croisée des médicaments réalisés ; c'est le cas pour la fabrication des antibiotiques, des produits à base de stéroïdes, des phénothiazines, ...

c) Matériel de fabrication

Le matériel et les machines en particulier doivent être conçus en tenant compte des risques de pollution : ainsi, les homogénéiseurs, qui possèdent des endroits difficilement accessibles au nettoyage, deviennent rapidement des sources de contamination. Les machines, récipients, tuyauteries, ... exigent un nettoyage et une désinfection quotidiens (même une stérilisation, si nécessaire). La fréquence des nettoyages sera déterminée après étude préalable entre ingénieurs et hygiénistes.

Les machines doivent être également nettoyées à l'aide de différents produits, dont les principaux sont le formol, l'hypochlorite et les ammoniums quaternaires.

Les doses moyennes d'emploi de ces produits sont les suivantes :

- *formol* : il est utilisé sous forme de dilution à 4 p. 1000 de la solution de formaldéhyde du commerce. C'est un produit très actif, à employer dans les cas de contamination importante et en dehors des périodes de travail à cause de son odeur irritante ; son utilisation doit être suivie d'un rinçage abondant.
- *hypochlorite* : on l'utilise en solutions renfermant au moins 10 g d'eau de Javel du commerce par litre d'eau de lavage.
- *ammoniums quaternaires* : en solution à 5-10 g au litre ; mais souvent ils moussent beaucoup et nécessitent un rinçage abondant et méticuleux.

d) Manipulation des matières premières

La manipulation des matières premières appelle une attention particulière. En règle générale, celles-ci seront de préférence véhiculées et manipulées mécaniquement dans des appareillages aussi clos que possible, qui seront eux-mêmes lavés, désinfectés et stérilisés régulièrement. La manipulation des constituants doit être réduite et, dans le cas d'opérations manuelles, le port de gants est recommandé.

e) Formulation et procédés de fabrication

La formulation d'une spécialité doit être établie en fonction du risque minimal de pollution. Par exemple, chaque fois que cela sera possible, l'amidon de maïs, peu souillé, sera choisi de préférence à l'amidon de riz ou de pomme de terre, nettement plus contaminé..

Des ingrédients peuvent être ajoutés en cours ou en fin de fabrication : s'ils sont fortement pollués, ils viendraient alors supprimer tous les effets des précautions prises jusqu'à ce stade, en apportant leurs lots de germes polluants ; ainsi, certaines solutions de colorants

utilisées pour la dragéification contiennent parfois jusqu'à 2×10^7 germes au ml lorsqu'elles ont été préparées à l'avance et stockées plus ou moins longtemps pour des emplois peu fréquents. Il serait préférable de disposer dans ce cas d'ampoules unidoses stériles.

Il faut également songer à définir les différents procédés de fabrication en fonction de la propreté microbiologique à atteindre. Avant de lancer toute production, il convient d'approfondir cet aspect du problème. Citons l'exemple des produits intermédiaires fortement pollués parfois utilisés en cours de fabrication : c'est le cas de l'air comprimé non filtré utilisé en fabrication pour le séchage, pour le transport de certaines matières premières, pour le nettoyage des machines, des récipients de stockage, des conditionnements, ... Au cours d'une de nos enquêtes microbiologiques sur la fabrication d'un sirop, nous avons constaté que les flacons vides étaient pollués à la suite de leur nettoyage par soufflage d'air comprimé non filtré.

o o o o o o o

IV - FACTEURS MODIFIANT LE DEVELOPPEMENT DE LA CONTAMINATION

Les germes présents dans une préparation peuvent se multiplier plus ou moins rapidement ou être inhibés sous l'influence de plusieurs facteurs :

1°) Matières premières

Certaines matières premières d'une composition médicamenteuse peuvent être utilisées par les germes comme éléments nutritifs ou comme source d'énergie, et permettre ainsi leur développement : c'est le cas de la gélatine (41), de certains conservateurs, d'extraits végétaux, d'enzymes, d'hydrolysats de protéines, de farines, de sucres, d'amidons, de gommes, ...

Les micro-organismes sont capables d'utiliser des produits anioniques comme source d'énergie : selon SAWYER & RYCKMAN (18), les alkylsulfates, esters, amides et dérivés du propylèneglycol à faible poids moléculaire, sont rapidement scindés, tandis que les alkylarylsulfonates, les alkylphénoxy-polyoxyéthanol et les dérivés du poly-

éthylèneglycol à poids moléculaire élevé sont attaqués plus lentement.

L'huile d'arachide est utilisée comme source de carbone par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus cohnii*, *Rhizopus arrhizus* ; certaines espèces de *Penicillium* peuvent métaboliser l'huile de paraffine (17) ; d'autres se développent intensément en solution concentrée de sulfate de cuivre. A signaler également la pollution mycélienne dans des solutions de sulfate de zinc. Les extraits hépatiques et les produits contenant des vitamines du groupe B peuvent être des facteurs de croissance pour certains micro-organismes.

Cas particulier du sucre

Le sucre est conservé en sacs ou en vrac dans des silos. Dans ces deux cas, il ne risque guère d'être contaminé par l'extérieur au cours du stockage. Mais la flore initiale qu'il contient peut régresser ou se développer dans certaines conditions :

- si le sucre est bien sec, les germes qui le contaminent ne trouveront pas un milieu favorable et ne se développeront pas : leur nombre, dans ce cas, ira en diminuant (en particulier les levures) (40),
- s'il est humide ou le devient au contact d'un air extérieur humide, ou pour toute autre cause, les quelques micro-organismes initialement présents se développeront et leur nombre pourra atteindre plusieurs milliers ou plus au gramme.

Il s'agit, dans ce cas, de germes très spéciaux appelés germes osmophiles, qui se multiplient en milieu très concentré en sucre (*Penicillium glaucum* (118), *Monilia nigra*, *Monilia fusca* (31)). Ces germes ont la propriété de liquéfier le sucre, quand il est stocké pendant une longue période (plus d'un mois), en atmosphère très humide et chaude. En se développant, les micro-organismes, principalement les champignons microscopiques, intervertissent en glucose et fructose le saccharose du film recouvrant les cristaux. Le fructose, plus hygroscopique que le saccharose, absorbe l'eau de l'atmosphère et dilue ainsi le sirop, qui dissout le sucre. Les germes, trouvant un nouvel

aliment, continuent à intervertir le saccharose, et l'attaque se poursuit jusqu'à liquéfaction totale du sucre cristallisé (40).

Ces inconvénients (grand nombre de germes nuisibles et apparition de sucres réducteurs) sont souvent très gênants pour les utilisateurs de sucre. Il est donc nécessaire d'avoir un magasin de stockage bien clos, sans communication avec l'extérieur, d'en déshumidifier l'air, soit à l'aide d'un point froid, soit au moyen d'un déshydratant régénérable (gel de silice). Les installations de ce genre sont bien au point, mais naturellement coûteuses (40).

2°) Conditionnement

Les matières plastiques tendent à supplanter de plus en plus dans l'industrie pharmaceutique les matériaux traditionnels d'emballage, mais pour les formes liquides, le verre reste encore aujourd'hui le plus largement utilisé.

Par suite d'un conditionnement défectueux, une contamination est possible aux divers stades suivants :

- avant remplissage : mauvais lavage, absence de désinfection ou de stérilisation des récipients ;
- au remplissage : s'il n'est pas fait mécaniquement et le plus rapidement possible, dans une atmosphère propre (U.V. indirects, flux d'air laminaire, vêtements spéciaux du personnel, ...) ;
- après remplissage :
 - *mauvais emballage* (manque d'étanchéité, perméabilité éventuelle aux micro-organismes, surtout dans le cas des matières plastiques),
 - *incompatibilité* entre les capsules en caoutchouc et certains conservateurs (absorption ou adsorption partielle des phénols, métacrésols, organomercuriels),

- *nature des joints* défavorable (capes, bouchons, capsules),
- *qualité des colles* utilisées, en particulier les colles aqueuses à base de dextrine,
- *conditionnement mal adapté* : pots à large ouverture, flacons avec compte gouttes dits plongeants ou volants, modèles de grande capacité, qui, une fois ouverts, sont utilisés sur une période de temps plus ou moins longue.

o o o o o o o

Le problème de l'amélioration de la qualité du conditionnement relève de la technologie pharmaceutique par deux points :

a) Afin d'éviter une contamination microbienne extérieure, il est indispensable, dans l'industrie pharmaceutique, d'employer un conditionnement unitaire commercial, imperméable, d'une protection efficace assurant le stockage par tous temps. Ce contenant doit permettre de préférence un contrôle visuel du contenu, principalement pour les liquides, ceci afin de pouvoir déceler un trouble dû à un développement éventuel de micro-organismes. En outre, le conditionnement doit être conçu de telle sorte qu'une fois ouvert, il soit le moins contaminé possible (ouverture des flacons de liquides protégée et de faible diamètre ; comprimés, dragées ou suppositoires en alvéoles unitaires, ...)

b) Le maintien d'un bas niveau de contamination par micro-organismes au moment ou en cours d'utilisation trouverait une solution heureuse par la réalisation de conditionnements en doses unitaires. En effet, une étude antérieure a montré que sur 24 tubes de pommade ophtalmique analysés avant usage, un seul a présenté une contamination, tandis que sur 50 échantillons utilisés, 18 étaient pollués par *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus* et des *fungi* (73).

De même, dans un service de dermatologie, sur 194 pots de crème et pommade analysés avant utilisation, 27 contenaient des colonies de *Pseudomonas aeruginosa*, mais après utilisation, 6 étaient infectés par la flore de la peau et 3 par des coliformes. Ces derniers contaminants n'étaient pas présents dans les échantillons en stock : ils furent intro-

duits par l'utilisateur au début de l'emploi du médicament (87).

o o o o o o o

Une technique relativement récente et perfectionnée est apparue sur le marché pour lutter contre cette pollution : c'est le *flacon sous pression de gaz inerte muni d'une valve doseuse* (106). Le principe consiste en une chambre de dosage, placée à l'extrémité du récipient; la distribution du liquide est indépendante de la pression du gaz propulseur; la dose délivrée est assez reproductible.

Le produit est éjecté par la pression du gaz propulseur choisi dans une membrane élastique, dont la déformation est limitée par une cloche doseuse de volume déterminé.

Cette valve, dénommée flacon-ampoule, permet, dans le cas des sirops, de distribuer, à l'abri de toute contamination microbienne, des quantités de médicaments correspondant à une cuillerée à café ou à soupe. Il va de soi que le gaz propulseur doit être stérile.

Les avantages de cette présentation sont nombreux :

- inviolabilité du conditionnement,
- absence de contamination extérieure de toute sorte en cours d'utilisation,
- meilleure conservation sous gaz inerte,
- facilité d'emploi.

L'emploi de doses unitaires serait certes souhaitable dans certains cas pour une meilleure conservation et utilisation du médicament, ceci dans la mesure où cette présentation est compatible avec la réglementation et certaines exigences administratives.

3°) Température

La température a deux principaux effets sur les préparations pharmaceutiques :

a) Elle peut influencer plus ou moins sur la croissance des germes dans certaines conditions.

LAMBIN & Coll. (71) ont classé les bactéries en quatre catégories, possédant chacune une zone de température dite eugénésique, qui permet la multiplication bactérienne avec des limites inférieure et supérieure encadrant cette zone.

Le tableau ci-après précise ces températures (71).

	minimum	optimum	maximum
Bactéries cryophiles	- 10°C	+ 15°C-20°C	+ 30°C
Bactéries mésophiles	+ 10°C-15°C	+ 18°C-37°C	+ 40°C-50°C
Bactéries thermophiles	+ 45°C-50°C	+ 50°C-55°C	+ 60°C-75°C
Bactéries thermorésistantes		≥ 65°C	

Bactéries cryophiles (ou psychrophiles) :

Elles sont présentes dans le sol, l'air, l'eau douce ou salée, les aliments, ... Leur optimum de croissance se situe entre + 15°C et + 20°C, et leur maximum, généralement voisin de + 30°C, peut atteindre + 45°C (71). Celles dont l'optimum de température est inférieur à + 20°C sont rarement rencontrées. Les bactéries cryophiles peuvent pousser abondamment à 0°C en deux semaines et leur recherche a principalement un intérêt dans le cas de l'emploi de matières premières et de médicaments conservés à très basse température (produits d'origine sanguine, sérums, vaccins, ...)

Bactéries mésophiles :

C'est la catégorie la plus importante, avec une zone optimale de température de croissance comprise entre + 18°C et + 25°C pour les bactéries saprophytes et + 25°C et + 37°C pour les bactéries pathogènes, pour l'homme et les animaux à sang chaud (71). C'est donc ce groupe de germes que l'on rencontre le plus souvent dans les contaminations des médicaments et qui risque de se multiplier le plus facilement, les différentes opérations de fabrication étant réalisées dans cette zone de température, qu'il serait souhaitable d'éviter également pour le stockage dans la mesure du possible.

Bactéries thermophiles :

Elles se rencontrent dans les sources thermales chaudes, les sols cultivés, les fumiers, les conserves alimentaires. Leur température minimale de culture varie de + 45°C à + 50°C avec un maximum pouvant atteindre + 75°C.

Bactéries thermorésistantes :

Elles se développent bien à des températures supérieures à + 65°C. Dans le contrôle microbiologique de certains produits, il y aura lieu de tenir compte de ces températures d'incubation.

b) De brusques variations de température et les variations saisonnières peuvent modifier certaines conditions physico-chimiques des préparations pharmaceutiques et favoriser par la suite un développement microbien : en effet, dans le cas des sirops, toute élévation de température produit un accroissement de l'humidité relative dans l'espace laissé libre au-dessus du sirop, et tout refroidissement consécutif entraîne alors la condensation de la vapeur d'eau précédente en une fine couche d'eau à la surface du sirop ; le sucre diffuse lentement de la masse de la solution dans cette couche, mais avant que l'homogénéité ne soit établie, l'alternance des températures de stockage produit un abaissement de la concentration en saccharose dans la couche superficielle et rend le développement des moisissures possible en surface.

4°) pH

Seule une zone relativement étroite de pH pour les bactéries et un peu plus grande pour les champignons microscopiques favorise le développement de ces micro-organismes.

Les bactéries se développent bien dans des milieux voisins de la neutralité (pH 7 à 7,2) ou légèrement alcalins. Elles sont inhibées pour la plupart dans un milieu acide, contrairement aux champignons microscopiques (71). Pour chaque bactérie, il existe des pH limites de multiplication avec un optimum :

- à part quelques exceptions comme *Escherichia coli*, divers *Proteus*, ou le vibrion cholérique, qui peut se multiplier à pH 9, la grande majorité des bactéries pathogènes ne se développe qu'entre pH 6,2 et 7,5 avec un pH optimal compris entre 6,8 et 7,2 (71).

- les bactéries saprophytes, elles, se développent en général entre pH 5 et 8,5.

La figure suivante schématise très simplement les zones favorables de croissance pour les bactéries pathogènes et saprophytes (zones hachurées) :

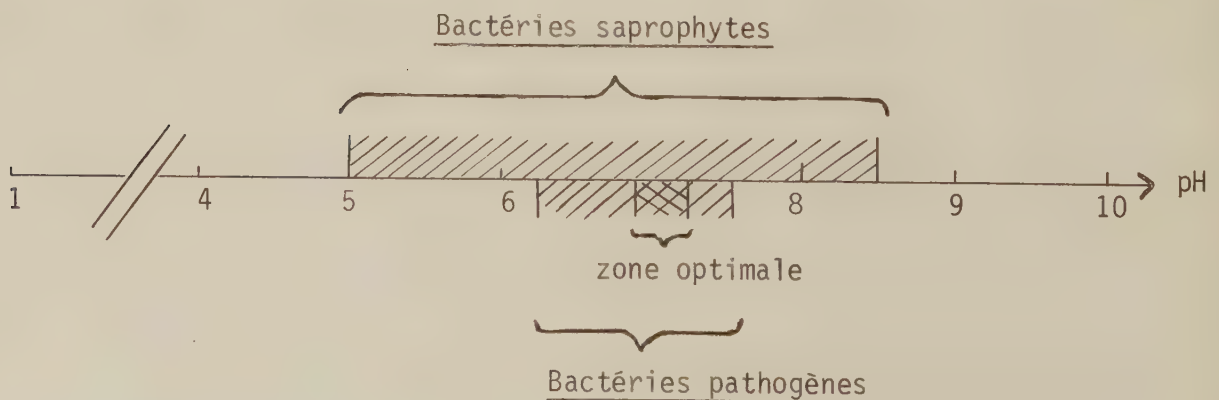


Figure 1

Bien que les pH des zones plus acides ou plus alcalines ralentissent le développement microbien (16), certains germes s'adaptent et se multiplient à des pH inhabituels (pH 9 pour le Bacille pestueux, par exemple) (71).

Parfois, il arrive que le conservateur employé ne présente pas son activité optimale d'inhibition au même pH que celui correspondant au développement des micro-organismes ; toute préparation, qui ne respecte pas à la fois les zones de pH défavorables à la multiplication des germes et favorables à l'activité du conservateur présent, risque d'avoir une flore microbienne importante.

5°) Pression osmotique

La pression osmotique en milieu aqueux peut avoir un effet inhibiteur sur la croissance des germes. Les corps de micro-organismes sont entourés d'une membrane semi-perméable vivante et tout changement brutal ou même lent, mais profond, de l'environnement, peut aboutir, soit au gonflement, à la rupture de la membrane, soit à la déshydratation des micro-organismes (18).

- Alors qu'à basse concentration, la glycérine peut être utilisée comme aliment par les germes, ce même produit, à des concentrations variant entre 40 et 50 %, est un inhibiteur de leur croissance, en raison de son action sur la pression osmotique.

Il en est de même pour les concentrations élevées en électrolytes (K^+ , Na^+) (18) : en général, de faibles concentrations dans le milieu favorisent le développement microbien et des concentrations élevées, supérieures à 65 % en poids, le freinent (16).

WALLHÄUSSER & SCHMIDT (128) citent le cas de différents sucres ayant par effet osmotique une action bactériostatique ou bactéricide sur quelques germes (*Streptococcus lactis*, *liquefaciens*, *Bacillus calidolactis*, ...) ; ce sont, par ordre décroissant d'activité (128) :

SUCRES	CONCENTRATIONS OPTIMALES %
<i>Fructose</i>	27,5 à 60
<i>Glucose</i>	35 à 60
<i>Lactose</i>	30 à saturation
<i>Saccharose</i>	60 à saturation

Les sirops contenant, selon leur définition même, une forte proportion de sucre, (donc ayant une pression osmotique élevée), devraient avoir, excepté à leur surface, un effet bactériostatique ou fongistatique sur les germes qu'ils renferment.

Cependant, les micro-organismes présents en début de fabrication ont de fortes chances de persister, surtout en l'absence de conservateurs, et de se développer dès que les conditions leur deviendront favorables.

BARBEROT, PINZON & MIRIMANOFF (14), au cours de l'étude d'une méthode de contrôle microbiologique de la conservation de certaines formes galéniques, ont remarqué que des champignons microscopiques ajoutés à des sirops se maintenaient à un niveau constant quant à leur nombre.

A titre d'exemple, le graphique ci-joint, établi par ces auteurs, illustre bien ce phénomène (Figure 2, page 27).

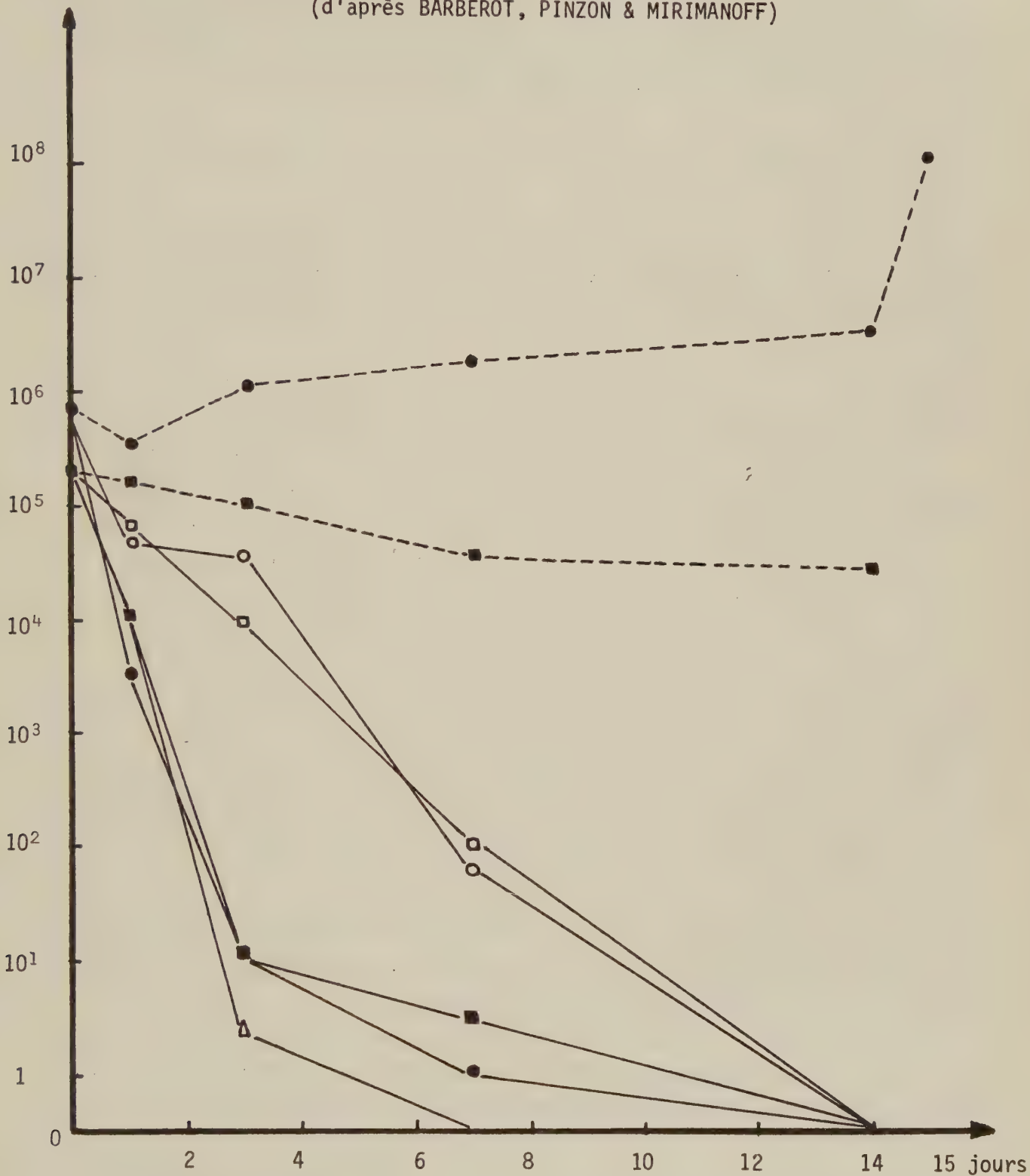
Ces mêmes auteurs signalent que dans les sirops sans agent conservateur, seule la levure osmophile peut se développer, sauf dans le cas d'un sirop de tolu-gaïacosulfonate de potassium, qui manifeste un certain effet fongistatique. Les moisissures banales et les bactéries n'y prospèrent pas.

Cependant, l'infestation massive par les spores fongiques entraîne une altération des sirops.

INFLUENCE DE DIFFERENTS CONSERVATEURS ET DE LA PRESSION OSMOTIQUE SUR LES
CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES INTRODUITS ARTIFICIELLEMENT DANS UN SIROP DE GUIMAUVE

(formule Ph. Helv. V)
(d'après BARBEROT, PINZON & MIRIMANOFF)

Germes/ml



Aspergillus niger

- sans agent conservateur
- avec acide sorbique 0,1 %
- Δ— avec acide benzoïque 0,1 %
- avec p-hydroxybenzoate de méthyle
p-hydroxybenzoate de propyle (7 : 3) 0,1 %.

Saccharomyces rouxi

- sans agent conservateur
- avec acide sorbique 0,1 %
- avec p-hydroxybenzoate de méthyle
p-hydroxybenzoate de propyle (7 : 3) 0,1 %.

Figure 2

Quant aux *sirops pour diabétiques*, où le sucre est remplacé par d'autres ingrédients, comme la carboxyméthylcellulose sodique et un édulcorant ou du sorbitol, ils constituent un milieu de culture favorable aux micro-organismes. Mais ce ne sont pas, au regard de la législation française, de vrais sirops.

6°) Conservateurs

Ils doivent être utilisés d'une manière judicieuse, principalement pour prévenir une contamination avant et durant la période d'utilisation d'un médicament, et non pour masquer de fortes pollutions initiales.

En effet, ils peuvent être ou devenir sans effet, soit par mauvaise utilisation qualitative ou quantitative, soit par absorption, adsorption, décomposition ou précipitation, et permettre alors à une flore initialement présente de se développer. Certains germes même attaquent les conservateurs et leur font perdre évidemment leur pouvoir inhibiteur. C'est ainsi que SOKOLSKI & Coll. (119) ont montré que *Cladosporium resinae*, en grande quantité dans un lot de pectine, a été capable d'hydrolyser le parahydroxybenzoate de méthyle en acide parahydroxybenzoïque en secrétant une estérase.

Ce même conservateur a été attaqué par *Pseudomonas aeruginosa* dans des préparations antirachitiques à base de calcium et de sels minéraux où il était présent (82).

De même, sous certaines conditions, des bactéries peuvent oxyder les phénols (ortho, méta et paracrésols, dinitro-4, 6 orthocrésol) à des pH compris entre 7 et 8 (18).

Chaque conservateur utilisé pour une forme galénique donnée doit être choisi selon les principaux critères suivants :

- innocuité : les conservateurs peuvent être toxiques ou jouer le rôle d'allergènes,

- absence d'incompatibilité avec les composants du médicament : par action directe ou indirecte, les conservateurs étant susceptibles de modifier les conditions physico-chimiques du milieu dans lequel ils se trouvent,
- stabilité,
- absence d'incidences analytiques : leur présence est susceptible de masquer des bactéries pathogènes au cours du contrôle microbiologique ou de perturber les contrôles physico-chimiques,
- spectre d'activité aussi large que possible, de façon à éviter la prolifération des micro-organismes résistant à leur action,
- enfin, selon BOEHM (24), BRIGGS & Coll. (28) les conservateurs ne doivent pas être considérés comme adjuvants, mais comme partie intégrante des préparations.

Cas des sirops

Les sirops peuvent, comme nous l'avons vu, constituer un milieu favorable à la croissance des moisissures. Ils sont généralement protégés de façon satisfaisante par l'addition d'alcool, de glycérine à haute concentration, ou surtout d'un mélange d'esters de l'acide parahydroxybenzoïque (0,08 % et 0,02 % respectivement pour les esters méthyle et propyle). L'acide sorbique aux concentrations de 0,15 à 0,20 % est utilisé pour la conservation des sirops contenant d'autres polyols que le saccharose, notamment du sorbitol, surtout si ces produits sont destinés aux pays tropicaux. Certains sirops de fruits peuvent être protégés contre les moisissures par addition d'acide sulfureux ou de métabisulfite de sodium à une dose correspondant à 350 p.p.m. de SO_2 (British Pharmaceutical Codex).

7°) Adaptation des germes aux conditions défavorables de développement

Certains germes s'accoutument aux conditions défavorables de développement et peuvent alors se multiplier. En voici quelques exemples :

- dans des milieux pauvres en eau libre (germes *osmophiles*),
- à des températures nettement plus basses ou plus élevées que les températures usuelles (102),
- à des pH extrêmes (pH 1,5 pour les moisissures, pH 11 pour les *Pseudomonas*).

Certains germes peuvent ramener le pH à une valeur qui leur est plus favorable en modifiant la composition du milieu par destruction d'acides aminés :

- si le pH est trop alcalin, il y a une action en désamination, qui libérera l'ion ammonium et laissera un produit de dégradation acide,

- si le pH est trop acide, il y a libération de CO_2 par décarboxylation et il restera des produits de dégradation alcalins (amines) (18).

De même, les germes peuvent dégrader par leurs réactions biochimiques, des molécules complexes dont les produits qui en découlent leur apporteront énergie et matériaux nécessaires à la synthèse de leur protoplasme pour leur croissance.

Enfin, le phénomène de résistance et de sélection des germes au contact des conservateurs ou antibiotiques est bien connu.

8°) Mode de préparation

L'exemple le plus frappant est la granulation par voie humide pour la fabrication de comprimés renfermant de l'amidon comme excipient : selon que l'opération s'effectue plus ou moins rapidement, que l'on utilise de l'eau ou de l'alcool, que la température de séchage est plus ou moins proche de 35°C à 40°C, le développement microbien est plus ou moins important.

De même, les périodes pendant lesquelles des températures élevées favorisent une culture microbienne doivent être aussi courtes que possible et suivies d'un refroidissement rapide adéquat. En effet, un

granulé humidifié porté à 40°C lors du séchage, peut devenir un milieu idéal de prolifération microbienne en fonction de sa composition : KALLINGS & Coll. rapportent que de l'amidon de pomme de terre contenant au départ 120 coliformes au gramme, puis séché à 35°C, contient après 24 heures 10 000 germes au gramme (61).

V - GERMES DECELES PAR DIVERS AUTEURS LORS D'ETUDES ANTERIEURES ET NORMES OU PROPOSITIONS DEJA EXISTANTES

1°) Germes décelés par divers auteurs lors d'études antérieures

De nombreux auteurs ont signalé des germes, dont les origines sont variées : *air, eau, sol, flore intestinale, peau.*

On peut les classer comme suit :

B A C T E R I E S

En suivant la classification de PREVOT (1948) (53), les principales bactéries rencontrées sont mentionnées dans le tableau I pages 32 à 35.

Tableau I - BACTERIES RENCONTREES DANS DIVERS PRODUITS CONTAMINES

CLASSE	ORDRE	FAMILLE	TRIBU	GENRE	ESPECE	PRODUITS CONTAMINES	Réf.
- I - SUBACTERIALES SPORULEES	- I - MICROCOCCALES	- I - MICROCOCCACEAE	- I - STREPTOCOCCAE	- I - STREPTOCOCCUS	<i>Str. faecalis</i>	sucres - crèmes - pommades	39/61
					<i>Str. lactis</i>	sucres -	39
					<i>Str. hemolyticus</i>	sirops -	55
				-II- LEUCONOSTOC	<i>L. mesenteroides</i>	sucres -	39
			-II- STAPHYLOCOCCAE	- I - GAFFKYA		crème pour les mains	61
			-III- MICROCOCCAE	- I - SARCINA	<i>St. aureus</i>	crème pour bébés-comprimés	61/51
					<i>St. albus</i>	eau - sucres - pommade ophtalmique - poudre - comprimés - sirops	61/131 61/55
					<i>St. epidermidis</i>	sirops	55
				-II- MICROCOCCUS	<i>M. pyogenes</i>	émulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
						émulsions pharmaceutiques et cosmétiques - sucres	18/39

Tableau I - (suite) BACTERIES RENCONTREES DANS DIVERS PRODUITS CONTAMINES

CLASSE	ORDRE	FAMILLE	TRIBU	GENRE	ESPECE	PRODUITS CONTAMINES	Réf.
-II- BACTERIALES		- I - ENTEROBACTERIA- CEAE	- I - ESCHERICHEAE	- I - ESCHERICHIA	<i>E. coli</i>	amidon - gomme arabique - prednisolone - talc - poudre de réglisse - poudre - com- primés - eau - sucres -	82/90 51 131
						émulsions pharmaceutiques et cosmétiques - sucres -	18 39
				-II- AEROBACTER	<i>K. aerobacter</i> <i>K. pneumoniae</i>	eau - lait acidifié -	51 82
			-II- PROTEAE	PROTEUS	<i>P. morgani</i> <i>P. rettgeri</i>	gouttes nasales - gouttes nasales -	74 74
			-III- SALMONELLEAE	- I - SALMONELLA	<i>S. dubana</i> <i>S. muenchen</i>	capsules de rouge carmin ser- vant dans les hôpitaux aux investigations des fonctions gastro-intestinales - comprimés à base d'extrait thyroïdien -	74 111

Tableau I - (suite) BACTERIES RENCONTREES DANS DIVERS PRODUITS CONTAMINES

CLASSE	ORDRE	FAMILLE	TRIBU	GENRE	ESPECE	PRODUITS CONTAMINES	Réf.
					<i>S. bareilly</i>	comprimés à base de nitrate- poudre de feuilles de jabo- randi et de séné -	111
				- II - GROUPE ALCALIGENES		eau - pommade ophtalmique - crème pour les mains - comprimés	51/61
		- II - PSEUDOMONADACEAE	- II - PSEUDOMONADEAE	PSEUDOMONAS	<i>P. aeruginosa</i>	eau - crème - collyres - pommade ophtalmique à base d'antibiotiques - crème à base de stéroïdes - poudres -	51/108 29/30/ 61/108
			- II - CHROMOBACTEREAE	- I - FLAVOBACTERIUM		sirops -	55
				- II - SERRATIA		préparation pour nouveau né à base d'hexachlorophène - émulsions pharmaceutique et cosmétique -	74 18

Tableau I - (suite) BACTERIES RENCONTREES DANS DIVERS PRODUITS CONTAMINES

CLASSE	ORDRE	FAMILLE	TRIBU	GENRE	ESPECE	PRODUITS CONTAMINES	Réf.
-III- EUBACTERIALES SPORULEES	- I - BACILLALES	BACILLACEAE		BACILLUS	<i>B. subtilis</i>	pommades -	61
					<i>B. cereus</i>	crème - sucres -	61/39
					<i>B. pumilus</i>	liniments -	61/11
					<i>B. stearothermophilus</i>	poudres - comprimés - sucres -	61/39
					<i>B. sphaericus</i>	poudres -	132
	-II- CLOSTRIDIALES	CLOSTRIDIACEAE		CLOSTRIDIUM	<i>B. mesentericus</i>	sucres -	31
					<i>Cl. thermo-saccharolyticum</i>	sucres -	40
					<i>Cl. nigrificans</i>	sucres -	40

Tableau II

CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES RENCONTRES DANS DIVERS PRODUITS CONTAMINES

	NATURE DU PRODUIT CONTAMINE	Réf.
<u>LEVURES</u>		
<i>Candida albicans</i>	Emulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
<i>Candida guilliermondi</i>	" "	18
<i>Monilia nigra</i>	Sucres	118
<i>Monilia fusca</i>	Sucres	31
<i>Rhodotorula minuta</i>	Emulsions pharmaceutiques et sucres	131
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	" "	131
<i>Torula sp.</i>	" "	18
<i>Torulopsis sp.</i>	Crèmes pour bébés	61
	Emulsions pharmaceutiques et sucres	131
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	" "	131
<i>Schizosaccharomyces sp.</i>	" "	131
<u>CHAMPIGNONS DIVERS</u>		
<i>Alternaria sp.</i>	Emulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
<i>Aspergillus sp.</i>	" "	18
	Pommades ophtalmiques à base de pénicilline G	27
<i>Citromyces sp.</i>	Emulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
<i>Cladosporium sp.</i>	" "	18
<i>Dematium sp.</i>	" "	18
<i>Fusarium sp.</i>	" "	18
<i>Geotrichum sp.</i>	" "	18
<i>Helminthosporium sp.</i>	" "	18
<i>Hormodendron sp.</i>	" "	18
<i>Mucor racemosus</i>	Emulsions pharmaceutiques et sucres	131/18
<i>Penicillium sp.</i>	Emulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
<i>Penicillium glaucum</i>	et pommades ophtalmiques à base de pénicilline G et sucres	27
		131
<i>Phoma sp.</i>	Emulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
<i>Poecilomyces varioti</i>	Comprimés	61
<i>Rhizopus sp.</i>	Emulsions pharmaceutiques et cosmétiques	18
<i>Stemphylium sp.</i>	" "	18
<i>Thamnidium sp.</i>	" "	18
<i>Trichotecium sp.</i>	" "	18
<i>Verticillium sp.</i>	" "	18

C H A M P I G N O N S M I C R O S C O P I Q U E S

Sous l'action de divers agents, les levures et moisissures, tels que *Saccharomyces* par exemple, peuvent provoquer la fermentation alcoolique, lactique, butyrique des sirops, dans certaines conditions.(115).

Nous avons relevé quelques exemples de contaminations mentionnés dans la littérature et retrouvés dans les préparations pharmaceutiques en général (Tableau II, page 36).

2°) Normes ou propositions déjà existantes

Toutes les incidences de la contamination microbienne sur l'innocuité et la stabilité des spécialités pharmaceutiques *non stériles* ont amené divers responsables, chercheurs et contrôleurs, à tenter de définir des *normes raisonnables* concernant le nombre et la nature des germes tolérables dans les diverses préparations de ce type.

Les pharmacopées de la plupart des pays ont déjà édicté une réglementation pour les préparations injectables et parfois même pour les collyres. Mais en ce qui concerne les autres préparations, nous avons relevé quelques cas, où des normes plus ou moins définies sont mentionnées :

- la troisième édition de la Pharmacopée tchécoslovaque fixe des normes pour les médicaments non stériles, qu'elle divise en deux groupes :

- . une première catégorie de produits (spécialités pharmaceutiques) *ne doit pas contenir plus de 1 000 germes non pathogènes au g ou au ml*, dont pas plus de 100 levures ou moisissures,
- . une deuxième catégorie de produits (autres produits pharmaceutiques) *ne doit pas contenir plus de 10 000 germes non pathogènes au g ou au ml*, dont pas plus de 100 levures ou moisissures.

- la deuxième édition de la *Pharmacopée internationale* (11-95) fixe pour les médicaments non stériles des normes au moins égales à celles imposées pour les matières alimentaires par la loi du pays intéressé,
- l'USP XVIII recommande l'application de règles de bonne fabrication du point de vue microbien et institue des normes pour certains produits, tels que :
 - gomme arabique : absence de *Salmonelles*
 - Agar : absence de *Salmonelles*
 - charbon actif : absence de *Salmonelles* et d'*E. coli*
 - suspension orale d'alumine et de magnésium : moins de 100 germes aérobies totaux au ml et absence d'*E. coli*.

Ces analyses doivent être effectuées selon les directives de *l'essai microbien limite*.

Des normes officielles sont actuellement recommandées en Suède (59).

- Le nombre total de germes ne doit pas dépasser 100 au g ou au ml. Si la matière première est conforme et si le produit a été bien fabriqué, la recherche des germes pathogènes n'est pas nécessaire.
- Si ce nombre est dépassé, les germes pathogènes ou témoins de mauvaise fabrication sont recherchés : *Salmonelles*, *Coliformes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* et *perfringens*.

D'autres pays et organismes (F.I.P., Pharmacopée nordique, F.D.A., B.P., ...) étudient le problème et vraisemblablement des normes de plus en plus sévères deviendront légales. Déjà, dans des publications sur ces problèmes, divers auteurs (DONY & Coll., KNUSEL & Coll. et PENSO) ont proposé des normes, que nous donnons ci-après, en comparaison avec certains produits alimentaires.

1 - *Produits alimentaires et diététiques :*

- lait pasteurisé : < 30 000 germes au g (125)
- lait médicamenteux : < 15 000 germes au g (44)
- levures pharmaceutiques : < 7 500 bactéries et 50 champignons microscopiques au g (USP XVIII et National Formulary)
- gélatine : < 5 000 germes au g (USP XVIII)
- semi-conserves : < 10 000 germes au g (33)

2 - *Médicaments à niveau de contamination microbienne contrôlée
(par opposition aux médicaments stériles)*

a) Absence de germes pathogènes (42) (4) (43)

(Salmonella, Shigella, Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa, Coliformes).

Comme nous l'avons vu, pour KALLINGS & Coll., la recherche des germes pathogènes serait facultative s'il y a moins de 100 germes au g ou au ml (61) ; elle serait obligatoire s'il y en a plus de 100 (61).

b) Absence de germes faisant suspecter une pollution fécale
(4) (43) (82)

c) Absence de germes toxigènes ou de toxines

(Clostridium botulinum, Clostridium perfringens dans 5 g de produit, Staphylococcus aureus dans 0,1 g de produit) (43) (82).

d) Limitation du nombre de germes saprophytes

Les chiffres avancés varient de 100 à 10 000, selon les auteurs et les formes galéniques :

- moins de 100 germes revivifiables au g ou au ml de produit à usage local (82) (67) (42) (54),

- moins de 10 000 germes revivifiables au g ou au ml de
préparation orale (4) (43) (41).

o o o o o o o

Mais avant de définir des normes officielles et si possible internationales, il est indispensable de se rendre compte qualitativement et quantitativement de l'état de contamination des différentes formes galéniques commercialisées, ainsi que des matières premières servant à leur préparation. Dans ce but, et pour apporter notre contribution dans ce domaine, nous avons limité le présent travail à l'étude des *sirops pharmaceutiques commercialisés en France*, qui offrent un intérêt particulier : ce sont des formes liquides orales, contenant une forte proportion d'eau, constituant donc un milieu favorable aux cultures microbiennes malgré l'influence d'une pression osmotique importante résultant de leur teneur élevée en saccharose.

Par ailleurs, dans le cas des sirops, préparations liquides, la contamination se propage plus aisément dans l'ensemble du milieu que dans le cas de préparations solides.

Il ne faut également pas oublier que les préparations liquides orales, en particulier les sirops, s'adressent principalement à deux catégories d'utilisateurs : les enfants et les personnes âgées, qui sont les plus sensibles aux infections.

o o o o o o o

CHAPITRE 2 : RECHERCHES PERSONNELLES

CHAPITRE 2 : RECHERCHES PERSONNELLES

I - SIROPS PHARMACEUTIQUES COMMERCIALISES EN FRANCE, OBJETS DE L'ETUDE

1°) Définition

Avant d'aborder notre étude, il nous apparaît utile de rappeler ici la définition du terme sirop selon la Pharmacopée française (8ème édition, 1965, page 985).

"Les sirops sont des préparations aqueuses contenant une forte proportion de sucre, ce qui leur donne leur consistance et assure leur conservation sous certaines conditions.

D'une manière générale, les sirops renferment les deux tiers de leur poids de sucre. Leur densité est alors voisine de 1,32 à température de 20°C et de 1,26 à la température de l'ébullition, qui est de 105°C environ.

Pour la préparation des sirops, on emploie le sucre blanc officinal. La proportion exacte en est fixée pour chaque cas particulier, mais elle ne doit jamais être inférieure à 45 p. 100 en poids. La préparation des sirops peut provoquer l'hydrolyse d'une certaine proportion de saccharose ; le même phénomène peut se produire et même s'accentuer, au cours de la conservation, et ceci en fonction de la composition du sirop ; c'est, en particulier, le cas pour les sirops acides, dans lesquels le saccharose peut être totalement hydrolysé.

Les liquides qui servent à dissoudre le sucre dans la plupart des sirops sont de natures diverses, eaux distillées, solutés, etc ...

Certains sirops se préparent en ajoutant au sirop simple ou à divers sirops aromatiques, soit des solutions aqueuses concentrées de substances médicamenteuses ou d'extraits, soit des

teintures alcooliques. Dans certains cas, on dissout par trituration dans le sirop des substances chimiques préalablement réduites en poudre. On peut préparer les sirops avec des solutions concentrées des principes végétaux (extraits concentrés pour sirops).

La clarification des sirops, lorsqu'elle est nécessaire, peut être réalisée avec la pâte de papier, avec le blanc d'oeuf ou par d'autres procédés appropriés."

Dans cette définition, les points suivants méritent d'être soulignés :

- préparations aqueuses,
- forte proportion de sucre, jamais inférieure à 45 % en poids,
- densité : 1,32 à 20°C et 1,26 à 105°C,
- sirops préparés par addition de solutions, extraits, teintures,
- clarification.

Nous avons donc été amenés à ne considérer comme sirops que les préparations aqueuses limpides et répondant à la définition ci-avant de la Pharmacopée française. Nous les appellerons *sirops vrais* par opposition aux *formes apparentées voisines*, qui n'ont pas été retenues pour la présente étude. A quelques unités près, 271 spécialités sont actuellement commercialisées en pharmacie en France et se répartissent comme suit :

- sirops vrais	237
- granulés pour sirop	6
- poudres pour sirop	2
- suspensions sirupeuses	26
Total	271

Parmi les 237 sirops vrais, notre étude n'a porté que sur 200 échantillons, les autres n'ayant pu faire l'objet d'examen.

Nous classerons les sirops retenus pour analyses en fonction de trois principaux critères, sous deux rubriques :

1 - Indication thérapeutique et catégories d'utilisateurs :

Adultes (A), Enfants (E), Nourrissons (N), Adultes-Enfants (AE),
Adultes-Enfants-Nourrissons (AEN), Enfants-Nourrissons (EN).

2 - Conservateurs et produits apparentés annoncés.

2°) Classification selon les indications thérapeutiques et par catégories d'utilisateurs

Le tableau ci-dessous et de la page suivante résume cette classification pour les 200 sirops examinés.

TABLEAU III

INDICATIONS THERAPEUTIQUES	CATEGORIES D'UTILISATEURS						TOTAL
	A*	E*	N*	AEN*	AE*	EN*	
<i>BRONCHES ET POUMONS</i>							
- anti-dyspnéiques (analeptiques respiratoires, bronchodilatateurs, antiasthmatiques, eupnéiques divers)				1	5		6
- anti-tussifs proprement dits	3	4	1	3	13	3	27
- antiseptiques broncho-pulmonaires (médications respiratoires électives à action antiseptique, anti-tussive, expectorante, fluidifiante, ...)	24	17	7	7	44	5	104
<i>FOIE ET VOIES BILIAIRES</i>							
- stimulant hépato-biliaire plus ou moins complexe				1			1
- hépatoprotecteur proprement dit				1			1
<i>VOIES DIGESTIVES</i>							
- topique gastro-intestinal, adsorbant, astringent et antidiarrhéique, divers,...				1			1
- eupeptique						1	1
- anthelmintiques				2	4	1	7
- laxatifs				2			2

TABLEAU III (Suite)

INDICATIONS THERAPEUTIQUES	CATEGORIES D'UTILISATEURS						TOTAL
	A*	E*	N*	AEN*	AE*	EN*	
<i>NUTRITION, ALLERGIE, VITAMINES</i>							
- toniques généraux et reconstituants				6	8	3	17
- allergie : antihistaminiques				6	2	4	12
- terrain rhumatismal et arthritique				1			1
- vitaminothérapie :							
- médication renfermant une seule vitamine non associée				2			2
- médication renfermant deux ou plusieurs vitamines non associées à d'autres principes actifs				2		1	3
<i>SYSTEME NERVEUX ET SYSTEME NEUROVEGETATIF</i>							
- hypnosédatifs et régulateurs neurovégétatifs				4	1	2	7
- neuroleptiques, tranquillisants et apparentés				1	2		3
- antispasmodique viscéral général					1		1
- anticonvulsivant				1			1
- anti-énurétique					1		1
<i>SYNDROMES INFLAMMATOIRES, MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES</i>							
- anti-inflammatoires (analgésiques, antipyrétiques, antirhumatismaux)				2		1	3
- antisyphilitique				1			1
- médication anti-infectieuse					1		1
<i>OTHO RHINO LARYNGOLOGIE</i>							
- préparation locale à usage bucco-pharyngé et gingivodentaire				1			1
- médicaments internes indiquées comme décongestifs rhino-pharyngés	1	1			1		3
<i>HEMOSTASE - REANIMATION - INTOXICATION</i>							
- préparations ioniques et nutritives diverses				1	2		3
- antitoxique et antidote				1			1

A* = Adultes

E* = Enfants

N* = Nourrissons

AEN* = Adultes-Enfants-Nourrissons

AE* = Adultes-Enfants

EN* = Enfants-Nourrissons

Quelques remarques s'imposent :

- *la forme galénique sirop semble s'adresser plus aux adultes et aux enfants qu'aux nourrissons,*
- *la principale indication thérapeutique concerne les affections de l'appareil respiratoire - 137 sirops sur 200, avec une prédominance d'antiseptiques bronchopulmonaires - 104 ; viennent ensuite, beaucoup moins nombreux, les médicaments toniques - 17 - et anti-allergiques - 12,*
- *peu de sirops contiennent des produits d'origine animale (opothérapiques). Nous en avons relevé 3 :*
 - 1 à base de bile dépigmentée,
 - 1 à base de fer globinique,
 - 1 à base d'extrait soluble de foie de veau,
- *les produits d'origine végétale contenus dans les sirops sont variés : on les trouve sous forme de plantes : 16 échantillons ; d'extraits alcooliques : 21 ; d'extraits hydro-alcooliques : 10 ; de sirop de tolu : 32 ; de sirop de fumeterre : 2 ; de sirop de bourgeons de pins et d'eucalyptus : 7 ; de sirop de serpolet et d'érysimum : 1.*

3°) Classification d'après les conservateurs et produits apparentés annoncés

Sur les 200 sirops, 10 ne portaient la mention d'aucun conservateur. Ceux qui étaient annoncés ont été classés dans le tableau des pages 46 à 49, accompagnés de leurs synonymes, pH optimaux d'activité, propriétés principales, critères d'utilisation, incompatibilités et spectres d'activité.

Nous avons également relevé certaines substances entrant dans la composition des sirops et susceptibles d'agir sur le développement des micro-organismes (produits apparentés). C'est le cas, par exemple, des *anti-oxydants*, qui ont une influence indirecte sur le développement des micro-organismes en modifiant les conditions du milieu. En effet, ils agissent sur les facteurs de sensibilisation par inhibition ou atténuation des effets photochimiques, biologiques et catalytiques des pigments ou métaux. En outre, certains oxydants ont en plus un pouvoir bactériostatique, fongistatique, bactéricide ou fongicide ; c'est le cas de la rongalite (115), qui a une action mixte : anti-oxydante et antiseptique.

Tableau IV - PRINCIPAUX CONSERVATEURS ET PRODUITS APPARENTES MENTIONNES SUR LES SIROPS ANALYSES

PRODUITS	SYNONYMES	pH OPTIMAL d'ACTIVITE	INCOMPATIBILITES	PRINCIPALES UTILISATIONS ET CONCENTRATIONS USUELLES	NOMBRE DE SIROPS EN CONTENANT	Références
ACIDE ASCORBIQUE	Facteur vitaminique C		salicylate de sodium, nitrite de sodium, méthénamine, théobro- mine salisodique	formes pharmaceutiques, liquides (sirops, suspensions, pommades, (5 mg/g). (en synergie avec l'acide citri- que).	7	115
ACIDE BENZOIQUE		< 4,5 - 5,0	peu d'incompatibili- tés → complexes avec ma- cromolécules	préparations orales (sirops, suspensions,...) surtout fon- gostatique (env. 5 mg/ml)	8	128 58
ACIDE CITRIQUE		3 - 4	tartrate de potassium acétates, sulfites	en synergie avec Co ₂ (sous pres- sion dans les boissons)	6	128
ACIDE FORMIQUE ET DERIVES		2 - 3		boissons (jus de fruits), confitures (0,1 g/kg)	1	128
ACIDE SALICYLIQUE ET DERIVES	Acide 0-hy- droxybenzoï- que		Sels ferriques acétate de plomb iode	conservateur alimentaire (1 %)	1	128 7
ACIDE SORBIQUE		< 4,5 - 5	peu d'incompatibili- tés	préparations orales (sirops, suspensions, ...) surtout fon- gostatiques : [préparations cutanées (0,1 à 0,2 %)] conservateur alimentaire	4	128 58 91

Tableau IV (suite) - PRINCIPAUX CONSERVATEURS ET PRODUITS APPARENTES MENTIONNES SUR LES SIROPS ANALYSES

PRODUITS	SYNONYMES	pH OPTIMAL d'ACTIVITE	INCOMPATIBILITES	PRINCIPALES UTILISATIONS ET CONCENTRATIONS USUELLES	Nombre de sirops en contenant	Références
ALCOOLS ET PRODUITS EN CONTENANT (élixirs, extraits alcooliques, tein- tures,...)	Ethanol			solutions ORL, sirops, prépara- tions pharmaceutiques à base de protéolysats, préparations anti- septiques externes (10 à 20 %)	98	128 91
BENZOATE DE SODIUM			métaux alcalins et sels de métaux lourds	émulsions, sirops (0,1 %)	64	128 91
BOROTARTRATE DE SODIUM ET DE POTASSIUM	Tétraborol Tartrate bo- rosodique et boropotassi- que			rencontré dans un échantillon de sirop	1	82
GAIACOL ET DERIVES				préparations externes, sirops	55	72
GLYCERINE	Glycérol propane triol			sirops, suspensions, solutions O.R.L. Effet déshydratant à haute concentration	12	128

Tableau IV (suite) - PRINCIPAUX CONSERVATEURS ET PRODUITS APPARENTES MENTIONNES SUR LES SIROPS ANALYSES

PRODUITS	SYNONYMES	pH OPTIMAL d'ACTIVITE	INCOMPATIBILITES	PRINCIPALES UTILISATIONS ET CONCENTRATIONS USUELLES	Nombre de sirops en contenant	Références
HUILES ESSENTIELLES (par ordre décroissant) Bois de santal, Niaouli, Vetiver, Rose, Néroli, Citro- nelle, Geranium, Laurier, Patchouli, Jasmin, Anis, Ylang- Ylang, Citron	Essences			gouttes, liniments, produits pour inhalations (0,5 % à 1 %)	16	128
HYDROXYQUINOLEINE	Oxychinol Oxychinoline Oxyquinol Oxine-8 qui- nolol	3,5 - 4		préparations externes, sirops	55	72 48 128
IODURE DE MERCURE				pommades ophtalmiques et dermi- ques (1 - 5 %)	1	128
LACTO CREOSOTE				rencontrée dans un sirop	1	72
MENTHOL	L-méthyl Isopropyl Cyclohexanol		mélangé avec des subs- tances à fonction al- déhyde et phénol, il se l'acquie	pommades (1 %) - huiles, sprays (5 %)	3	72
OLEATE DE SODIUM	Eunatrol			solutions pour lavage de plaies (2 %)	1	72

Tableau IV (suite) - PRINCIPAUX CONSERVATEURS ET PRODUITS APPARENTES MENTIONNES SUR LES SIROPS ANALYSES

PRODUITS	SYNONYMES	PH OPTIMAL d'ACTIVITE	INCOMPATIBILITES	PRINCIPALES UTILISATIONS ET CONCENTRATIONS USUELLES	Nombre de sirops en contenant	Références
PROPYLENE GLYCOL	D-L propyl Glycol			sirops (potentialise l'effet des esters de l'acide p-hydroxybenzoïque)	1	128
p-HYDROXYBENZOATE DE METHYLE et SEL SODIQUE	Paraoxybenzoate de méthyle, Nipagine, Nipagine M	4,0 - 8,0	- incompatibilités générales des phénols, - formation de complexes avec les macromolécules, - précipitation avec procaine, pénicilline.	préparations pharmaceutiques diverses (sirops, suspensions, solutés injectables, pommades) (0,8%, avec une limite $\leq 1,5$ %) crèmes, émulsions (0,5 %)	65	128
p-HYDROXYBENZOATE DE PROPYLE ET SEL SODIQUE	Paraoxybenzoate de propyle, Nipasol, Nipasol M			souvent utilisé avec l'ester méthylique (0,02 % - 0,04 %), mélange des deux esters principalement actif contre les champignons microscopiques (<i>Asp. niger</i> , <i>Asp. orizae</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Sacch. cerevisiae</i>)	27	128
SUCRES				protègent les préparations pharmaceutiques où ils se trouvent à forte concentration (action sur la pression osmotique) (60 - 70 %)	200	128
THYMOL ET DERIVES				solutés pharmaceutiques divers 0,05 % - 0,10 %	1	128
TOCOPHEROLS	Facteur vitaminique E inhibitol (mélange de 4 isomères)			protection des principes lipophiles, en synergie avec amines, acides ascorbiques, citrique et phosphorique.	2	115

II - METHODOLOGIE

Etant donné l'influence prépondérante de certains paramètres dans les recherches microbiologiques, les méthodes d'étude doivent être parfaitement définies pour aboutir à des résultats valables et reproductibles.

Nous avons donc été amenés à déterminer les divers facteurs majeurs intervenant dans ces recherches, afin d'établir une méthode rigoureuse permettant de comparer les différentes fabrications.

1°) Paramètres influant sur les techniques

a) Importance de l'échantillonnage par rapport au lot à analyser

Le nombre d'échantillons à analyser doit être en principe suffisamment représentatif pour permettre de détecter les contaminations microbiennes d'une fabrication.

Le volume de chaque échantillon sur lequel portera l'analyse microbiologique doit être le plus grand possible, afin d'accroître les chances de trouver les souillures peu importantes, qui pourraient passer inaperçues pour de faibles volumes.

En cas d'impossibilité technique, plusieurs petites prises d'essai du même échantillon doivent être analysées, si l'on veut obtenir un résultat significatif.

b) Préincubation des échantillons à analyser

Dans le secteur alimentaire, la préincubation pour le contrôle des conserves et des semi-conserves revêt une grande importance. DONY & Coll. (43) proposent un traitement analogue pour les produits pharmaceutiques, en vue de rechercher avec une plus grande certitude les micro-organismes anaérobies générateurs de toxines et de gaz.

Pour ces auteurs, la préincubation a pour but de :

- déceler les germes résistant aux conservateurs ajoutés et capables de se développer ultérieurement,
- vérifier l'efficacité du conservateur éventuel,
- s'assurer de la stabilité du produit (pas de modification favorisant un développement microbien),
- accélérer le développement possible de germes peu nombreux au départ.

En conséquence, il paraît utile d'envisager une *préincubation ou épreuve de vieillissement* accélérée à 30°C - 32°C pendant quinze jours, accompagnée d'un bilan microbiologique avant et après le vieillissement.

c) Composition du liquide de dilution ou de dispersion

Ce liquide conditionne toute la suite des analyses. Il doit répondre à certains critères, en fonction de l'état physico-chimique et de l'origine du produit à analyser, notamment :

- *permettre une bonne mise en suspension des germes éventuellement présents*. Ceci suppose donc leur dispersion dans une phase liquide (aqueuse de préférence). On peut parfois faciliter la dispersion par adjonction de composés tensio-actifs, à condition que la concentration à laquelle ils sont introduits n'ait aucune influence sur le développement ultérieur des germes,
- *protéger les formes végétatives*, pour éviter qu'elles ne disparaissent,
- *réduire le temps de filtration*, dans le cas de l'emploi de membranes filtrantes,

- *inactiver les inhibiteurs du développement des micro-organismes* : ces inhibiteurs peuvent être soit le principe actif lui-même (antibiotiques, sulfamides, ...), soit les substances ajoutées au médicament pour assurer sa conservation (conservateurs).

Pour éliminer ces inhibiteurs, deux possibilités sont offertes :

- l'une consiste à ajouter un antagoniste spécifique au stade de la dilution ; mais il est préférable dans des cas précis de l'incorporer dans le liquide de rinçage ou dans les milieux de culture utilisés, certains de ces antagonistes étant adsorbés à la surface des micro-organismes et empêchant ainsi leur développement ;
- l'autre consiste à diluer la prise d'essai dans un grand volume de liquide. En effet, la dilution neutralise très souvent l'action inhibitrice du conservateur, en abaissant sa concentration à une valeur inférieure à sa concentration minimale d'inhibition. C'est parfois la seule possibilité, lorsqu'on ignore quels inhibiteurs sont contenus dans la prise d'essai (c'est le cas de notre étude), lorsqu'il n'existe pas d'inactivants (c'est le cas pour les phénols, crésols, formols, ...) ou lorsque les antagonistes spécifiques risquent d'être adsorbés à la surface des micro-organismes. A titre d'exemple, les esters de l'acide parahydroxybenzoïque, souvent ajoutés aux sirops, peuvent être inactivés par dilution.

Cependant, cette technique par dilution présente l'inconvénient de diminuer beaucoup la sensibilité de la méthode et il est préférable, quand cela est possible, d'utiliser la méthode dite des membranes filtrantes : celle-ci consiste à faire passer le produit ou sa dilution à travers une membrane filtrante de porosité et de composition bien définies ; après lavage destiné à éliminer les produits susceptibles d'exercer des activités antibactérienne ou antifongique, la membrane est déposée à la surface d'un milieu de culture solide ou immergée dans un milieu liquide selon les cas.

Ce procédé offre de nombreux avantages : il permet :

- de contrôler de grands volumes à la fois ;
- de recueillir sur un même filtre la totalité des germes d'une prise d'essai, tout en éliminant presque entièrement les inhibiteurs présents ;
- de procéder au lavage des germes, notamment s'ils peuvent adsorber des inhibiteurs ;
- d'éviter une interaction milieu de culture-produits (absence de précipitation, de coloration).

Cependant, il faut veiller à ce que les produits filtrés n'attaquent pas les pores de la membrane filtrante ; c'est le cas, par exemple du méthanol, de l'acétone, de l'acétate d'éthyle, ... Des essais préliminaires doivent être effectués.

Le liquide de dilution est très rarement de l'eau distillée seule, mais plutôt un soluté isotonique de chlorure de sodium, un milieu tamponné phosphaté ou une eau peptonée, additionnée ou non d'extrait de viande de boeuf, une eau faiblement gélosée contenant un agent antagoniste si nécessaire, ou un tensio-actif tel que le Tween 80 ou le Triton X-100, qui aura pour but de bien disperser les agglomérats (spores de moisissures, levures, bactéries) et de réduire le temps de filtration sur membrane.

Du sable ou des billes de verre peuvent être ajoutés dans le récipient contenant le liquide de dilution (93).

d) Durée de séjour des germes dans le liquide de dilution ou de dispersion

Les germes de contamination peuvent être soit dans leur état physiologique normal, soit dans un état déficient dû à l'action inhibante de certaines substances (antibiotiques, sulfamides) ou de certains facteurs (chauffage), qui peuvent diminuer temporairement leur vitalité.

Selon UEHLEKE (126) les germes plus ou moins altérés auront un début de croissance plus lent et plus difficile. Aussi est-il recommandé de les laisser de une à deux heures dans le liquide de dilution, avant analyse, afin de leur permettre de reprendre un état physiologique normal, cette courte période d'attente ne favorisant pas leur multiplication (79).

e) Agitation

La vitesse et la durée d'agitation du liquide de dilution contenant la prise d'essai à analyser contribuent à libérer et à répartir plus ou moins dans ce liquide les germes éventuellement présents.

La vitesse dépend du type d'appareil utilisé et SPICHER (121) a montré qu'un liquide agité manuellement libère beaucoup moins de germes qu'un liquide agité à l'aide d'un appareil type ULTRA TURRAX. *La durée optimale* d'agitation peut varier de 1 à 30 minutes. Certains auteurs ont constaté une augmentation du nombre de germes libérés au début de cette opération puis un palier, enfin une diminution (94).

Vitesse et durée d'agitation doivent donc être précisées avec soin pour éviter qu'elles n'entraînent une altération des micro-organismes.

f) Technique d'ensemencement des milieux de culture

Suivant les cas, deux méthodes peuvent être employées :

- ensemencement direct : à la surface d'un milieu solide ou par incorporation dans le milieu ; cette méthode, parfois indispensable, présente de nombreux inconvénients qui la rendent difficilement applicable.
 - . limitation du volume de la prise d'essaiensemencée,
 - . modifications physiques et chimiques du milieu de culture, inhibant le développement des germes (pH, production de substances toxiques, ...) ou rendant la lecture impossible (trouble, coagulation, coloration, ...),

. impossibilité d'éliminer les substances inhibitrices contenues dans la prise d'essai.

- ensemencement indirect : à l'aide de membranes filtrantes. Ce procédé défini précédemment page 52, élimine avantageusement tous les inconvénients mentionnés ci-avant.

g) Composition du liquide de rinçage

Dans la technique dite des membranes filtrantes, le rinçage est essentiel. Il doit entre autres :

- éliminer le maximum de substances parasites : par exemple, dans le cas des antibiotiques, il doit en désorber le maximum. Certains auteurs ont montré, par exemple, que le chlorure de sodium arrache la néomycine adsorbée à la membrane filtrante (esters de cellulose) (67),
- protéger les micro-organismes (addition au liquide de rinçage de peptone et d'extrait de viande de boeuf),
- inactiver à ce stade certains inhibiteurs de croissance des micro-organismes par adjonction d'antagonistes spécifiques. A titre d'exemple, on ajoute de la pénicilline au liquide de rinçage pour inactiver la pénicilline (27).

DESBORDES & Coll. (38) citent quelques exemples de substances pouvant neutraliser des inhibiteurs de croissance de germes : pénicilline pour la pénicilline ; cystéine, acide thioglycolique, hydrosulfite de sodium pour les sels de mercure ; lécitine, polysorbate pour les sels d'ammoniums quaternaires, ...

h) Milieux de culture

Dans un travail préliminaire, nous avons comparé les qualités des milieux de culture que nous avons préparé avec celles des milieux trouvés dans le commerce, à l'état de *poudres prêtes à l'emploi*. Les résultats ayant été identiques, nous avons donc utilisé ces derniers pour notre étude.

L'emploi de matières protéiques dégradées (peptones, autolysats de levure, extraits de viande, ...) apporte des protides, acides aminés, facteurs de croissance et substances vitaminiques, nécessaires au métabolisme bactérien.

La qualité des peptones joue un grand rôle dans ce domaine, leur teneur en acides aminés essentiels pouvant beaucoup varier d'un lot de fabrication à l'autre. C'est pourquoi, dans le protocole opératoire établi et exécuté avec soin, tous les paramètres concernant la préparation des milieux de culture ont été définis avec précision, afin d'obtenir des résultats reproductibles.

A ce stade, il est possible d'ajouter aux milieux des agents antagonistes tels que chlorure de sodium et acide ascorbique pour la néomycine, thioglycolate de sodium pour les organomercuriels, afin de neutraliser les substances inhibantes pouvant encore accompagner les germes.

i) Température et durée d'incubation

Dans notre étude, les germes recherchés sont des germes banaux, qui cultivent, comme nous l'avons vu page 22, dans une zone de température comprise entre 21°C et 46°C. C'est dans cette zone que les températures d'incubation ont été choisies.

La durée d'incubation ne fait pas l'unanimité des chercheurs ; elle peut varier de 7 à 15 jours, en fonction de l'état physiologique des germes ; l'apparition macroscopique des colonies peut être plus ou moins longue (incubation plus ou moins rapide). D'après les travaux de LAMBIN & Coll. (70), il semble bien qu'un temps d'incubation de 8 jours permet le développement de la quasi totalité des germes présents dans une culture.

Le tableau ci-après, que nous devons à ces auteurs, montre que sur 887 cultures positives constatées, 886 se sont développées avant le huitième jour.

TABLEAU V INFLUENCE DE LA DUREE D'INCUBATION

GERMES	CULTURES POSITIVES APRES					
	24 h	48 h	3 j	6 j	8 j	15 j
<u>BACTERIES AEROBIES</u>						
<i>Staphylococcus aureus</i>	108	24	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	92	3	3	4	2	1
<i>Streptococcus faecalis</i>	113	14	1	0	0	0
<i>Sarcina lutea</i>	3	112	12	1	4	0
Total	316	153	16	5	6	1
Pourcentage	63,5	30,7	3,2	1	1,4	0,2
<u>BACTERIES ANAEROBIES</u>						
<i>Welchia perfringens</i>	67	6	1	0	0	0
<i>Clostridium botulinum</i>	25 (+19 ±)	39	1	1	0	0
<i>Clostridium sporogenes</i>	61	5	1	1	0	0
<i>Plectridium tetani</i>	100	0	0	0	0	0
<i>Plectridium putrificum</i>	56	11	7	8	0	0
Total	309	61	10	10	0	0
Pourcentage	79,2	15,6	2,6	2,6	0	0
Total des tubes positifs pour les bactéries aérobies et anaérobies	625	214	26	15	6	1
Pourcentage	70,4	24,1	2,9	1,7	0,6	0,11

2°) Conditions opératoires adoptées

a) Principes généraux

Pour le contrôle microbiologique des sirops, que nous avons entrepris, nous avons adopté la méthode dite *des membranes filtrantes*, qui convient bien dans ce cas, les prises d'essai étant facilement filtrables après dilution. Toutes les manipulations ont été faites dans des conditions les plus aseptiques possibles. Pour cela, nous avons utilisé une *hotte à flux d'air laminaire* vertical stérile avec régulation de température.

La préincubation a été assimilée à un vieillissement de quelques mois, temps qui s'est écoulé en général, depuis la réception des échantillons jusqu'à leur analyse.

Après désinfection à l'alcool des flacons de sirop avant ouverture, les prélèvements ont été effectués aseptiquement à l'aide de pipettes stérilisées par chauffage à 190°C pendant une heure.

Les volumes prélevés varient de 0,1 ml à 10 ml, selon le degré de pollution déjà constaté lors d'un premier essai.

En général, les volumes de 1 ml et 5 ml donnent un développement microbien facile à dénombrer, un plus grand volume ne permettant pas une numération aisée. Il nous est arrivé d'être amenés à prélever des volumes extrêmes de 0,1 ml ou de 10 ml selon que le sirop était microbiologiquement très contaminé ou très propre. Lorsque cela a été possible, nous avons effectué plusieurs fois l'analyse d'un même sirop sur 2 ou 3 échantillons avec des prises d'essai de volumes différents.

b) Liquides de dilution et de rinçage

Le liquide de dilution est constitué par une solution à 0,1 % de peptone bactériologique et 0,1 % de polysorbate 80 dans l'eau distillée. Cette solution est répartie à raison de 200 ml par flacon puis stérilisée à l'autoclave pendant une demi-heure à 120°C.

La solution tamponnée phosphatée préconisée par certains auteurs n'a pas été retenue dans notre étude : elle peut provoquer parfois un précipité gênant la filtration et l'interprétation des résultats.

La filtration sur membrane, suivie d'un rinçage abondant permet de ne pas utiliser cette solution tamponnée phosphatée parfois employée pour neutraliser l'acidité ou l'alcalinité des prises d'essai.

Le rinçage de la membrane est effectué à l'aide de 200 ml de la même solution légèrement tiédie (liquide de dilution).

Les inhibiteurs présents dans la prise d'essai sont ainsi théoriquement éliminés ; nous avons cependant vérifié dans tous les cas que le rinçage de la membrane avait éliminé suffisamment de produit adsorbé pour lui ôter toute action inhibitrice.

c) Matériel de filtration

- Support de filtre

C'est une enceinte fermée, en matière plastique* *stérilisable à l'autoclave*, dont deux de ses orifices sont munis de filtres à air.

- Membrane filtrante

Couramment vendue dans le commerce, cette membrane est à base d'esters de cellulose ; la porosité choisie est de $0,45 \mu$ et son diamètre de 47 mm. De teinte blanche, elle possède un quadrillage imprimé indélébile, un large bord hydrophobe** empêchant la dilution de sirop à examiner de diffuser sur les bords et améliorant au cours du rinçage l'élimination des inhibiteurs éventuellement présents.

* *Sterifil*, marque déposée Millipore S.A.

** *M.F.* Membranes filtrantes, Millipore S.A.

Les membranes utilisées sont imprégnées d'un agent tensio-actif, indispensable pour la filtration : le TRITON X 100*.

Ce produit ne gêne en rien la bonne marche des essais, bien que certains auteurs lui aient trouvé une certaine action inhibitrice sur la culture de cellules mammaires (colonies L de fibroblastes de souris) (99) ; il est de toute façon éliminé : 200 ml de liquide de rinçage légèrement tiédi ajouté après filtration faisant disparaître ce tensio-actif de la membrane.

d) Mode opératoire

La prise d'essai est versée dans le flacon contenant les 200 ml de liquide de dilution. Le mélange est agité manuellement pendant une minute, mis au repos pendant une heure, puis filtré sur la membrane. Cette dernière est ensuite lavée avec 200 ml de liquide de rinçage stérile, préalablement passés dans le premier flacon ayant reçu la prise d'essai du sirop à analyser. Puis la membrane est déposée à la surface du milieu solide choisi, ou immergée dans le milieu si celui-ci est liquide.

REMARQUE : au cours de la manipulation, nous avons toujours évité le dessèchement de la membrane filtrante, qui risquerait de détruire jusqu'à près de 85 % des micro-organismes éventuellement présents (64).

e) Matériel de culture

Il consiste principalement en :

- étuves de précision réglées à + 22°C, + 30°C, + 37°C, + 46°C,
- boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre, en verre Pyrex, *pour les milieux solides*,
- fioles coniques d'Erlenmeyer de 250 ml à large ouverture, *pour les milieux liquides*,
- divers matériels de microbiologie (tubes, pipettes Pasteur, anses de platine, ...)

* TRITON X 100 : détergent non ionique type isooctyl phénoxy polyéthoxyéthanol (IPPE) (33)

f) Matériel de numération

Le dénombrement des colonies se fait généralement à l'oeil nu, mais l'on peut éventuellement s'aider d'une loupe.

3°) Isolement et numération des cinq groupes de germes essentiels

Les différents micro-organismes qui ont été systématiquement recherchés et éventuellement dénombrés, sont classés en cinq groupes. Parmi eux se retrouvent ceux déjà cités par différents auteurs (32).

L'identification de certains germes a été également effectuée. Le tableau ci-dessous et de la page suivante indique les noms de ces germes, des milieux de cultures et réactifs utilisés, ainsi que les températures et durées d'incubation retenues.

TABEAU VI - ISOLEMENT, NUMERATION ET IDENTIFICATION DES GERMES

Tableau résumé

Milieux pour germes totaux - Milieux sélectifs

GERMES	MILIEUX ET REACTIFS	INCUBATION	
		Température	Durée
AEROBIES TOTAUX	Gélose trypticase soja	30°C ± 2°C	1,2,3,7 jours
ANAEROBIES TOTAUX	Gélose trypticase soja	30°C ± 2°C	7 jours
CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES TOTAUX	Gélose type Sabouraud, glucosée	22°C ± 2°C	2,7 jours
ENTEROBACTERIACEES	<u>Enrichissement</u> Bouillon d'enrichissement E.E. BROTH	37°C ± 1°C	1 jour
	<u>Réensemencement</u> Gélose au cristal violet-rouge neutre, sels biliaires, <i>glucosée</i> "V.R.B. Agar"	37°C ± 1°C	1 jour
	Gélose au cristal violet-rouge neutre, sels biliaires, <i>non glucosée</i> "V.R.B. Agar"	37°C ± 1°C	1 jour
PSEUDOMONADACEES	Gélose Pseudose1	30°C ± 2°C	2 jours

TABLEAU VI (Suite)

GERMES	MILIEUX ET REACTIFS	INCUBATION	
		Température	Durée
STAPHYLOCOQUES PATHOGENES	<u>Enrichissement</u> Milieu hypersalé (simple concentration)	37°C ± 1°C	2 jours
	<u>Identification</u> Milieu de CHAPMAN	37°C ± 1°C	1 jour 1/2
	<u>Essais confirmatifs</u>		
	• { Bouillon nutritif peptoné	37°C ± 1°C	1 jour
	• { Plasma de lapin BBL (<i>coagulase</i>)	37°C ± 1°C	≤ 3 heures
	• { Milieu D.N. ase (<i>désoxyribonucléase</i>)	37°C ± 1°C	1 jour
	• { Gélose trypticase soja	37°C ± 1°C	1 jour
	• { Réactif n° 1 "Patho-staph-Kit" : phénylphosphate disodique + amino-4 antipyrine	37°C ± 1°C	30 minutes
	• { Réactif n° 2 : ferricyanure de po- tassium (<i>phosphatase</i>)	37°C ± 1°C	≤ 10 minutes
STREPTOCOQUES FECAUX	Milieu à l'azothhydrate et à l'éthyl violet	37°C ± 1°C	2 jours
GERMES SULFITO- REDUCTEURS (<i>Clostridium perfringens</i>)	Gélose trypticase, sulfite, néomycine	46°C ± 1°C	7 jours
DIFFERENCIATION DES ENTEROBACTERIACEES	Gélose xylose-lysine-désoxycholate	37°C ± 1°C	1,2 jours
	Bouillon de MOELLER	36°C ± 1°C	1,2,3,4 jours
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Réaction à l'oxydase : bichlorhydrate de tétraméthylparaphénylène diamine	ambiante	3-10 secondes

Le mode opératoire a été le suivant :

a) GERMES AEROBIES TOTAUX

Milieu : *Gélose Trypticase soja* (BBL) (98)

convient particulièrement bien à l'isolement des germes exigeants.

Composition *

Peptone trypsique de caséine (Trypticase BBL) ...	15 g
Peptone papaïnique de soja (Phytone BBL)	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH après stérilisation $7,3 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Mélanger soigneusement, faire chauffer doucement en agitant de temps en temps jusqu'à complète dissolution, puis laisser bouillir pendant une à deux minutes. Ajuster à pH convenable si nécessaire et compléter à un litre. Répartir le milieu en tubes à essais stériles de 16 X 160 mm à raison de 10 ml par tube ; stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes (98).

Utilisation

La membrane filtrante est mise directement sur le milieu préalablement coulé en boîtes de Pétri et solidifié. L'incubation a lieu à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La lecture est effectuée après 1, 2, 3, 7 jours.

* Les milieux marqués d'un astérisque sont préparés sous forme déshydratée par "Baltimore Biological Laboratory (BBL) et B.D. Mérieux.

b) GERMES ANAEROBIES TOTAUX

Milieu : même milieu que pour les aérobies : *Gélose Trypticase soja* (BBL) (98)

L'incubation se fait à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dans une jarre pour anaérobiose dans laquelle l'atmosphère est chargée en hydrogène et en gaz carbonique.

La lecture est faite uniquement après 7 jours, afin de ne pas rompre les conditions d'anaérobiose de la jarre.

Matériel d'incubation

Jarre pour anaérobiose

Elle est constituée par un récipient en verre Pyrex ou en matière plastique comportant un couvercle métallique muni d'un système de fermeture assurant une très bonne étanchéité. La partie inférieure du couvercle supporte un panier métallique renfermant un catalyseur (aluminium ou palladium).

Gaspaks (BBL) (98)

Ce sont des sachets de papier aluminium renfermant deux comprimés, l'un de borohydrure de sodium (générateur d'hydrogène), l'autre de bicarbonate de sodium et d'acide citrique (générateurs de gaz carbonique).

Sous l'influence du catalyseur, l'hydrogène libéré se combine à l'oxygène de l'air présent dans la jarre. La réaction est obtenue par simple addition de 10 ml d'eau distillée.

Un indicateur d'anaérobiose, constitué par un sachet de polythène rempli de solution de bleu de méthylène, dont la réduction entraîne la décoloration, assure de l'anaérobiose de l'atmosphère.

c) CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES

Milieu : *Gélose glucosée type SABOURAUD* (98)

Composition *

Peptone trypsique de caséine	{ Polypeptone BBL	5 g
Peptone pepsique de viande		5 g
Glucose		40 g
Gélose		15 g
Eau distillée q.s.p.		1000 ml

pH final après stérilisation $5,6 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Laisser au repos pendant 5 minutes. Mélanger soigneusement pour obtenir une suspension homogène. Faire chauffer doucement en agitant fréquemment jusqu'à complète dissolution et porter à ébullition pendant 1 à 2 minutes. Ajuster, si nécessaire, à pH convenable et compléter à 1 litre. Répartir le milieu en tubes à essais stériles de 16 x 160 mm, à raison de 10 ml par tubes, puis stériliser à l'autoclave à 118°C - 120°C pendant 15 minutes (98).

Ce milieu se conserve bien en réfrigérateur vers $+ 4^{\circ}\text{C}$ en récipients fermés hermétiquement.

Utilisation

Placer directement la membrane utilisée sur le milieu préalablement coulé en boîtes de Pétri, puis solidifié ; porter ensuite l'ensemble à l'étuve à $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, la lecture étant effectuée après 2 et 7 jours.

d) ENTEROBACTERIACEES

La recherche de ce groupe de bactéries a été faite dans le dessein de dépister les entérobactéries pathogènes, preuve d'une mauvaise hygiène en cours de fabrication.

α) Enrichissement

Milieu : dit "*E.E. BROTH*"

Bouillon spécial d'enrichissement de *MOSSEL, VISSER et CORNELISSEN* (86) (112) pour des entérobactériacées.

Composition

Peptone trypsique de caséine (Trypticase BBL) ...	10	g
Glucose	5	g
Phosphate disodique 2 H ₂ O	8	g
Phosphate monopotassique	2	g
Bile de boeuf pour bactériologie (OXGALL BBL) ..	20	g
Vert brillant	0,015	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $7,3 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Chauffer légèrement jusqu'à complète dissolution, ajuster si nécessaire à pH convenable et compléter à un litre. Répartir en fioles coniques stériles à raison de 100 ml par fiole et stériliser à l'autoclave pendant 5 minutes à 120°C. Après stérilisation, refroidir rapidement.

Utilisation

La membrane, sur laquelle la prise d'essai de sirop diluée a été filtrée, est immergée dans le milieu, puis l'ensemble est porté à l'étuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures.

β) Réensemencement

Milieu : *gélose au cristal violet, rouge neutre et sels biliaires.*

La présence de sels biliaires et de cristal violet inhibe les germes gram positif (98).

Composition *

Extrait de levure	3	g
Peptone tryptique de gélatine (géllysate BBL) ...	7	g
Sels biliaires	1,5	g
Lactose	10	g
Chlorure de sodium	5	g
Gélose	15	g
Rouge neutre	0,03	g
Cristal violet	0,002	g
Glucose	10	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $7,4 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution et agiter fortement, puis chauffer en agitant jusqu'à complète dissolution. Faire bouillir une minute. Compléter à un litre après avoir ajusté si nécessaire à pH convenable. Répartir en tubes à essais stériles de 16 X 160 mm, à raison de 10 ml par tube et stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C.

Utilisation

Le milieu, préalablement coulé en boîte de Pétri et solidifié, estensemencé à l'aide d'une anse de platine à partir des cultures positives précédentes, puis mis à incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. La lecture est faite après 24 heures : les colonies éventuelles présentent une coloration allant du rouge pourpre au rouge violacé. Ces colonies sont ensemencées à nouveau sur le même milieu, *mais non additionné de glucose* : les Coliformes donnent alors des colonies rouges, tandis que les Salmonelles et Shigelles se développent en colonies très pâles. Une différenciation plus poussée est alors effectuée sur des milieux plus spécialisés.

e) PSEUDOMONADACEES

Certains de ces germes sont parfois résistants aux conservateurs. Ils peuvent proliférer massivement, leurs besoins en éléments nutritifs étant extrêmement réduits. Parmi les nombreuses Pseudomonadacées, le principal germe est *Pseudomonas aeruginosa*.

Milieu : gélose Pseudose1 (BBL)

Ce milieu est sélectif pour l'isolement des Pseudomonas et principalement de *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de bromure de cétyle triméthyle ammonium inhibe la croissance de la plupart des autres micro-organismes, à l'exception des espèces cryophiles (98).

Composition *

Peptone tryptique de gélatine (géllysate BBL) ...	20	g
Chlorure de magnésium	1,4	g
Sulfate de potassium	10	g
Gélose desséchée	13,6	g
Bromure de cétyle triméthyle ammonium	0,3	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $7,2 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Ajouter 10 ml de glycérol. Chauffer en agitant fréquemment jusqu'à complète dissolution et faire bouillir pendant une minute. Ajuster si nécessaire à pH convenable et compléter à un litre. Répartir le milieu en tubes stériles de 16 X 160 mm à raison de 10 ml par tube, et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation

Après avoir placé directement la membrane utilisée sur le milieu préalablement coulé en boîtes de Pétri et solidifié, l'ensemble est mis à incuber à $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et la lecture est effectuée après 48 heures.

4°) Identification d'espèces particulières

Outre les cinq recherches précédentes, certaines identifications sont nécessaires (germes pathogènes ou témoins d'une contamination humaine).

a) STAPHYLOCOQUES PATHOGENES

Le protocole suivant a été appliqué en vue d'essayer de savoir si les sirops contenaient des germes répondant aux critères des staphylocoques pathogènes.

1 - Milieu d'enrichissement

Pour chaque sirop une prise d'essai de 5 ml a étéensemencée dans un *milieu liquide hypersalé à simple concentration* (34) :

Composition

Extrait de viande	3 g
Peptone tryptique de gélatine (géllysate BBL)....	5 g
Peptone pepsique de viande (Thiotone BBL)	2,5 g
Peptone tryptique de caséine (Trypticase BBL) ..	2,5 g
Chlorure de sodium	75 g
Lactose	7,5 g
Gélose en poudre	0,5 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH après stérilisation $7,3 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Agiter jusqu'à complète dissolution. Faire bouillir une minute, ajuster si nécessaire à pH convenable et compléter à un litre. Répartir dans des tubes stériles de 20 X 200 mm à raison de 50 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 115°C pendant 20 minutes.

Utilisation

Après ensemencement avec 5 ml de chaque échantillon de sirop, les milieux sont mis à l'étuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures. Après ce délai, les tubes dans lesquels aucun trouble n'est apparu peuvent être considérés comme correspondant à une prise d'essai ne contenant aucun staphylocoque pathogènes. Par contre, les tubes présentant un trouble sont susceptibles de contenir des staphylocoques pathogènes. Le milieu suivant est alors utilisé.

2 - Milieu d'identification

*Milieu de CHAPMAN ** (35)*

En plus du chlorure de sodium ajouté à forte concentration (75 %), ce milieu renferme du mannitol, dont la fermentation est mise en évidence par le virage d'un indicateur coloré, le rouge de phénol (98).

Composition *

Extrait de viande de boeuf	1	g
Peptone trypsique de caséine	5	g
Peptone trypsique de viande		
(Polypeptone BBL)		
Chlorure de sodium	75	g
Mannitol	10	g
Gélose	15	g
Rouge de phénol	0,025	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $7,4 \pm 0,2$

** Le milieu de BAIRD et PARKER à la sulfamézathine peut être utilisé à la place du milieu précédent, mais sa préparation est beaucoup plus complexe.

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Mélanger soigneusement puis dissoudre par chauffage doux en agitant fréquemment. Porter à ébullition pendant 1 à 2 minutes. Ajuster à pH convenable si nécessaire et compléter à un litre. Répartir en tubes à essais de 16 X 150 mm à raison de 10 ml par tube, et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation

A l'aide d'une anse en platine et à partir des milieux d'enrichissement précédents ayant présenté un trouble, ensemercer la surface des milieux de CHAPMAN préalablement coulés en boîtes de Pétri et solidifiés. Puis les porter 36 heures à l'étuve à 37°C $\pm$ 1°C. Après ce délai, les colonies de *staphylocoques non pathogènes* apparaissant petites et entourées d'une zone rouge ou pourpre.

Par contre, les colonies de *staphylocoques pouvant être pathogènes* sont entourées d'une zone jaune.

Cependant, ce critère est loin d'être suffisant, aussi les trois essais confirmatifs suivants sont-ils nécessaires :

3 - Essais confirmatifs

A partir de chacune des colonies considérées comme suspectes, en fonction de leur apparence sur le milieu de CHAPMAN, les essais suivants sont pratiqués :

α Recherche de la coagulase libre

Elle est mise en évidence à l'aide de plasma de lapin lyophilisé (BBL).

. Culture en milieu liquide des germes à identifier

Milieu :

Bouillon nutritif peptoné

Composition

Peptone trypsique de gélatine (géllysate BBL)	5 g
Extrait de viande de boeuf	3 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH après stérilisation $6,9 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Faire chauffer doucement et agiter pour obtenir une dissolution totale. Ajuster à pH convenable si nécessaire et compléter à 1 litre. Répartir en tubes stériles de 16 X 160 mm à raison de 10 ml par tube puis stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation

A l'aide d'une anse en platine, ensemençer les colonies suspectes du milieu de CHAPMAN sur le bouillon nutritif peptoné précédemment préparé. Laisser à l'étuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de 18 à 24 heures.

. Mise en évidence de la coagulase

Au moment de pratiquer l'épreuve, ajouter au plasma de lapin lyophilisé BBL le volume d'eau distillée indiqué sur le flacon, afin d'obtenir une dilution au 1/3.

Dans un tube à hémolyse mesurer 0,5 ml de la dilution de plasma de lapin BBL et 0,5 ml de bouillon de culture de staphylocoque à identifier. Agiter. Porter les tubes à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et les examiner toutes les demi-heures. La coagulation apparaît en

moins de trois heures* si la réaction est positive. En général la prise en masse du plasma est totale et le caillot adhère aux parois du tube.

Cet essai est effectué parallèlement avec une souche de staphylocoques coagulase positifs pour s'assurer de la qualité du plasma de lapin utilisé.

β-Recherche de la D.N. ase

A l'aide du *milieu D.N. ase* (BBL)

Composition *

Acide désoxyribonucléique	2 g
Peptone tryptique de caséine (Trypticase BBL) ..	15 g
Peptone papainique de soja (Phytone BBL)	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH après stérilisation $7,3 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Mélanger soigneusement. Chauffer en agitant jusqu'à complète dissolution et faire bouillir pendant une minute. Ajuster à pH convenable si nécessaire et compléter à un litre. Répartir en tubes à essais stériles de 16 X 160 mm à raison de 10 ml par tube. Stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C.

* La durée limite d'observation de 3 heures n'est valable qu'en utilisant du plasma de lapin BBL. Avec le plasma de lapin de l'Institut Pasteur la durée limite d'observation est de 24 heures.

Utilisation

Ensemencer à la surface du milieu préalablement coulé en boîtes de Pétri et solidifié, en stries radiées à partir du centre, les cultures provenant des colonies suspectes s'étant développées sur milieu de CHAPMAN, à raison d'une strie par culture : 6 d'entre elles peuvent être examinées simultanément sur une boîte. Porter à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. Verser alors à la surface du milieu une solution d'acide chlorhydrique N. La présence de D.N. ase se manifeste par une zone transparente autour de la strie, apparaissant en général après 5 minutes de contact.

γ Recherche de l'activité phosphatasique des staphylococques

Elle est effectuée à l'aide des réactifs "*Patho-Staph-Kit*" (BBL).

Réactif n° 1

Phénylphosphate disodique et amino-4-antipyrine.

Ce réactif présenté lyophilisé doit être conservé à $+ 4^{\circ}\text{C}$.

Une fois repris par 3 ml d'eau distillée, il peut se conserver pendant environ un mois à $+ 4^{\circ}\text{C}$ à l'abri de la lumière.

Réactif n° 2

Solution tamponnée de ferricyanure de potassium.

Ce réactif se conserve très bien à $+ 4^{\circ}\text{C}$.

Technique

Les germes suspects cultivés sur milieu de CHAPMAN sont ensemencés sur le milieu solide ayant servi à la recherche des aérobies totaux (gélose Trypticase soja).

Après 18 à 24 heures d'incubation à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, les bactéries sont récoltées pour faire une suspension microbienne très épaisse dans 0,5 ml d'eau distillée stérile contenue dans un tube à hémolyse. Ajouter 1 ml de réactif n° 1. Agiter et placer 30 minutes au bain-marie à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ajouter ensuite 1 ml de

réactif n° 2 et agiter. Une réaction positive se manifeste par l'apparition immédiate d'une couleur rouge grenat franc. On peut également observer une teinte légèrement rosée, témoin d'une activité phosphasique faible. La réaction est négative si aucun changement de coloration ne survient après l'addition du réactif n° 2.

La lecture doit être faite dans les 10 minutes qui suivent l'addition du réactif n° 2, la coloration rouge s'atténuant progressivement.

4 - Interprétation des résultats

Le pouvoir pathogène des staphylocoques est relativement discuté et assez difficile à définir : tout *staphylocoque coagulase positif* est considéré comme *pathogène*. Ce type de germe est en général accompagné d'un arsenal enzymatique important : désoxyribonucléase et phosphatase. Cependant, les *staphylocoques coagulase négatifs* possédant l'une de ces deux activités enzymatiques (forte activité phosphatasique) ou les deux à la fois, peuvent être considérés comme pathogènes sous certaines conditions :

- s'assurer que l'on est bien en présence de staphylocoques,
- s'assurer de la fermentation du mannitol en anaérobiose, car certains *micrococci* possèdent également une activité phosphatasique, mais sont aérobies stricts, contrairement aux staphylocoques, qui sont aérobies-anérobies facultatifs.

En s'inspirant de l'arrêté ministériel du 21 septembre 1968 concernant les méthodes officielles d'analyses bactériologiques des glaces et crèmes glacées, et d'après les travaux de H. BEERENS & Coll. (19), sur 745 souches appartenant à la famille des *Micrococcaceae* provenant de milieux biologiques divers (pus, crachats, urines, L.C.R., ...) n'ont été admis comme pathogènes dans notre étude que les staphylocoques répondant à l'un des critères suivants :

	①	C O A G U L A S E +
ou	②	{ coagulase - phosphatase + (<i>forte activité</i>) mannitol + (<i>en anaérobiose</i>)
ou	③	{ coagulase - phosphatase + (<i>faible activité</i>) D.N. ase + mannitol + (<i>en anaérobiose</i>)

5 - Contrôle de la validité de la méthode de recherche et d'identification des staphylocoques pathogènes

Afin de déceler l'influence éventuelle du sirop sur les souches de staphylocoques pathogènes et la validité de la méthode, il a été procédé à l'essai suivant :

100 ml de sirop stérile ont étéensemencés avec *Staphylococcus aureus* (coagulase +) et un volume identique avec *Staphylococcus epidermidis* (coagulase -).

Deux contrôles ont été alors effectués selon le protocole de la page 69 sur les deux sirops :

- l'un immédiatement après addition des souches de staphylocoques,
- l'autre après conservation des sirops pendant un mois à 37°C.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau ci-après :

Echantillons	Chapman (Mannitol+)	Coagulase	D.N. ase	Phosphatase	Anérobiose	Conclusions
Avec <i>Staphylococcus aureus</i> , non vieilli artificiellement	+	+	+	+	+	Pathogène
Avec <i>Staphylococcus aureus</i> , 1 mois à 37°C	+	-	+	Faible activité	+	Pathogène
Avec <i>Staphylococcus epidermidis</i> , non vieilli artificiellement	-	-	-	Très faible activité	+	Non pathogène
Avec <i>Staphylococcus epidermidis</i> , 1 mois à 37°C	-	-	-	-	+	Non pathogène

Il est intéressant de constater qu'en pratiquant un contrôle immédiatement après addition des souches de staphylocoques aux échantillons de sirop stérile, on retrouve les différentes caractéristiques enzymatiques de ces germes.

Par contre, après un mois de conservation à 37°C, *Staphylococcus aureus*. coagulase positif paraît perdre une partie de son activité enzymatique (coagulase -, activité phosphatasique faible).

b) STREPTOCOQUES FECAUX

Ces germes, témoins d'une contamination pouvant provenir d'eaux polluées, sont recherchés à l'aide du milieu suivant :

Milieu :

Bouillon à l'azothydrate-éthyl violet (98)

C'est un milieu sélectif décrit en 1955 par LITSKY, MALLMANN et FIFIELD.

Composition *

Hydrolysate de protéines animales et végétales (Biosate BBL)	20	g
Glucose	5	g
Chlorure de sodium	5	g
Phosphate dipotassique	2,7	g
Phosphate monopotassique	2,7	g
Azothydrate de sodium	0,40	g
Ethyl violet	0,00083	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $7,0 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution et mélanger soigneusement jusqu'à dissolution totale. Ajuster si nécessaire à pH convenable et compléter à 1 litre. Répartir en fioles coniques stériles à raison de 100 ml et stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 minutes.

Utilisation

L'ensemencement se fait de la même façon que pour le milieu d'enrichissement des Enterobactériacées (immersion dans le milieu de la membrane filtrante utilisée). L'incubation a lieu à l'étuve à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures. L'apparition d'un trouble et la formation d'un disque violacé au fond de la fiole caractérisent le développement des streptocoques fécaux.

c) GERMES SULFITO-REDUCTEURS	<i>Clostridium perfringens</i> :
------------------------------	----------------------------------

Ce germe, un des principaux représentant des germes sulfito-réducteurs, est le témoin de contaminations fécales ou telluriques. Il peut être présent dans certaines plaies et polluer ainsi des fabrications préparées sans soins.

Certains auteurs (BUHLMANN & Coll.) recommandent pour la recherche de ce germe le milieu suivant :

Gélose trypticase, sulfite, néomycine (gélose T.S.N. BBL)

Ce milieu décrit par MARSHALL, STEENBERGEN & Mc CLUNG (98) permet l'isolement sélectif de ces germes possédant un pouvoir sulfito-réducteur.

Composition *

Peptone trypsique de caséine (Trypticase BBL) ..	15	g
Sulfite de sodium	1	g
Sulfate de néomycine	0,02	g
Sulfate de polymyxine	0,05	g
Extrait de levure	10	g
Citrate de fer	0,5	g
Gélose	13,5	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $7,2 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution et mélanger soigneusement. Chauffer en agitant jusqu'à complète dissolution et porter à ébullition pendant une minute. Ajuster si nécessaire à pH convenable. Compléter à 1 litre. Répartir en tubes à essais de 16 X 160 mm, à raison de 10 ml par tube, et stériliser à l'autoclave à 118°C pendant 12 minutes. Laisser refroidir et stocker en réfrigérateur.

Utilisation

Les milieux coulés en boîtes de Pétri et refroidis sont ensemencés de la même manière que la gélose T.S.A. et placés dans une jarre pour culture en anaérobiose. L'incubation a lieu à $46^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 7 jours. Dans ces conditions, il se produit

un noircissement des colonies de *Clostridium perfringens*. Les boîtes de Pétri doivent être examinées immédiatement après leur sortie de la jarre, l'oxydation par l'air ambiant pouvant entraîner une décoloration des colonies.

d) DIFFERENCIATION DES ENTEROBACTERIACEES

La différenciation de ces germes est effectuée à l'aide de deux milieux :

1 - Milieu : *Gélose, xylose, lysine, désoxycholate (gélose X.L.D. BBL)*

Cette gélose est un milieu sélectif pour l'isolement des *entérobactéries pathogènes*, notamment des *Shigella*.

Composition *

Xylose	3,5	g
Lysine	5	g
Lactose	7,5	g
Saccharose	7,5	g
Chlorure de sodium	5	g
Extrait de levure	3	g
Rouge de phénol	0,08	g
Désoxycholate de sodium	2,5	g
Thiosulfate de sodium	6,80	g
Citrate de fer ammoniacal	0,8	g
Gélose	13,5	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH final $7,2 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Chauffer en agitant fréquemment jusqu'à 90°C environ, mais ne pas porter à ébullition. Arrêter le chauffage dès la dissolution complète.

Ajuster si nécessaire à pH convenable et compléter à 1 litre, puis laisser refroidir aux environs de 50°C et répartir en boîtes de Pétri. Le milieu, qui doit être clair ou presque clair, présente une couleur rouge orangée.

Un chauffage excessif ou le maintien trop prolongé du milieu à 50°C peut entraîner une précipitation. Dans ce cas, les colonies risquent de moins bien se développer et de donner des réactions moins nettes. La préparation de ce milieu doit se faire extemporanément.

Utilisation

Les milieux répartis en boîtes de Pétri sontensemencés à partir de chacune des colonies ayant cultivé sur la gélose au cristal violet-rouge neutre et sels biliaires. L'incubation a lieu à 37°C $\pm$ 1°C. Une première lecture est faite après 24 heures, puis une seconde après 48 heures, ce qui accroît le noircissement des colonies de *Salmonelles*.

L'aspect des colonies permet de grouper les germes en trois catégories (98) :

COLONIES	GENRE OU GROUPE
- <u>JAUNES</u>	<i>Escherichia</i> <i>Citrobacter</i> (Bethesda) <i>Enterobacter</i> <i>Proteus</i> <i>Serratia</i> <i>Klebsiella</i>
- <u>ROUGES</u>	<i>Shigella</i> <i>Providencia</i> <i>Salmonella</i> H ₂ S négatif (<i>Paratyphi A</i> , <i>Pullorum-gallinarum</i> , <i>Cholerae suis</i>)
- <u>ROUGES A CENTRE NOIR</u>	<i>Salmonella</i> <i>Arizona</i> <i>Asakusa</i>

Les colonies de *Salmonella*, qui donnent des colonies rouges sans centre noir, peuvent ressembler à celle de *Shigella*. Par ailleurs, certaines colonies de *Proteus* peuvent présenter un centre noir.

2 - Milieu : *bouillon de MOELLER*

Celui-ci permet de différencier les entérobactéries par la recherche des décarboxylases (84) (47) (98).

Composition *

Peptone pepsique de viande (Thiotone BBL)	5	g
Extrait de viande de boeuf	5	g
Bromocrésol pourpre	0,01	g
Rouge de crésol	0,005	g
Glucose	0,5	g
Pyridoxal	0,005	g
Eau distillée q.s.p.	1000	ml

pH après stérilisation $6,0 \pm 0,2$

Préparation

Mettre en suspension les substances ci-dessus dans de l'eau distillée pour obtenir un litre de solution. Ajouter 1 % de L-lysine, de L-arginine ou de L-ornithine, selon la préparation envisagée. Ajuster si nécessaire à pH convenable après addition des acides aminés. Compléter à 1 litre. Préparer des tubes à essais sans amino-acide qui serviront de témoins, et répartir à raison de 3 à 5 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 10 minutes. Un léger précipité peut se former dans les tubes renfermant de la L-ornithine, sans pour autant perturber les réactions.

Utilisation

Après avoir réensemencé sur gélose nutritive les colonies suspectes du milieu X.L.D. et laissé 24 heures à l'étuve à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, ensemercer chacun des tubes de bouillon de MOELLER

contenant de la L-lysine, L-arginine, L-ornithine et ceux sans acides aminés, avec une faible quantité de chaque culture ainsi obtenue. Recouvrir ensuite avec 4 à 5 mm d'huile de paraffine stérile. Porter à l'étuve à $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et observer chaque jour pendant 4 jours. Les réactions positives correspondant à une utilisation de l'acide-amino par les germes à identifier, se manifestent par une teinte violette ou rouge violacée (voir tableau VII ci-dessous).

TABLEAU VII - RECHERCHE DES DECARBOXYLASES PAR LA TECHNIQUE DE MOELLER (98)

GERMES	L-LYSINE	L-ARGININE	L-ORNITHINE
<i>Klebsiella</i>	+	-	-
<i>Enterobacter</i>			
<i>cloacae</i>	-	+	-
<i>aerogenes</i>	+	-	+
<i>alvei</i>	+	-	+
(22°C) <i>liquefaciens</i>	+	±	+
<i>Serratia</i>	+	-	+
<i>Citrobacter</i>	-	(+)	±
<i>Escherichia</i>	±	±	±
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>mirabilis</i>	-	-	+
<i>morganii</i>	-	-	+
<i>rettgeri</i>	-	-	-
<i>Providencia</i>	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	(+)	+
<i>S. paratyphi</i>	-	- ou (+)	+
<i>Arizona</i>	+	(+)	+
<i>Shigella</i>	-	- ou (+)	±
<i>Pseudomonas</i>	-	+	-
<i>Alcaligenes</i>	-	-	-
<i>Flavobacterium</i>	-	-	-

+ réaction positive

(+) réaction tardive

e) DIFFERENCIATION DES PSEUDOMONADACEES

Identification de *Pseudomonas aeruginosa*

Ce germe est particulièrement résistant à de nombreux conservateurs. Il peut être caractérisé par l'essai suivant :

Recherche de l'oxydase (test de KOVACS) (68)

Découper un carré d'environ 6 cm de côté de papier filtre WHATMAN n° 1. Le placer dans une boîte de Pétri stérile et déposer au centre du papier 2 à 3 gouttes de solution à 1 % de bichlorhydrate de tétraméthylparaphénylènediamine. Cette solution peut être conservée 2 semaines en réfrigérateur, en flacon compte-gouttes brun. A partir des cultures sur *gélose Pseudosel*, les colonies sont prélevées à l'aide d'une anse de platine puisensemencées largement sur le papier filtre ci-dessus imprégné de réactif, selon une strie de 3 à 6 mm. Si la réaction est positive, les coloniesensemencées virent au pourpre foncé en 5 à 10 secondes.

o o o o o o o

III - RESULTATS OBTENUS

1°) Considérations générales

Avant toute interprétation, les résultats obtenus méritent quelques remarques d'ordre général :

a) Importance des prises d'essai et nombre d'analyses effectuées

Pour un même sirop et dans de nombreux cas, *l'analyse a été répétée deux ou trois fois*; le tableau VIII de la page 86 résume toutes ces données.

Il est intéressant de relever que :

- une double analyse a été effectuée
 - . complètement sur 51,5 % des sirops (pour l'isolement et la numération des 5 groupes de germes),
 - . partiellement sur 62,5 % des sirops.
- pour les analyses négatives une première fois, les essais ont souvent été répétés une seconde et parfois même une troisième fois avec une *prise d'essai plus importante*.
- Les staphylocoques pathogènes, aérobies-anaérobies facultatifs ont été systématiquement recherchés quatre fois.
- Les différents germes et groupes de germes ont été en grande majorité recherchés sur une prise d'essai de 5 ml, ce qui donne à l'ensemble de l'étude une certaine homogénéité.

Tableau VIII - IMPORTANCE DES PRISES D'ESSAI et NOMBRE D'ANALYSES EFFECTUEES

GERMES RECHERCHES	NOMBRE D'ANALYSES EFFECTUEES SUR								NOMBRE D'ANALYSES EXECUTEES :								TOTAL des SIROPS ANALYSES	
	0,1 ml		1 ml		5 ml		10 ml		1 fois		2 fois		3 fois		4 fois			
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
Aérobies totaux	15	7,50	50	25	120	60	15	7,50	94	47	105	52,50	1	0,50			200	100
Anaérobies totaux	9	4,50	47	23,50	129	64,50	15	7,50	97	48,50	103	51,50					200	100
Champignons microscopiques totaux	6	3	15	7,50	165	82,50	14	7	76	38	121	60,50	3	1,50			200	100
Entérobactériacées					185	92,50	15	7,50	71	35,50	125	62,50	4	2			200	100
Pseudomonadacées					177	88,50	23	11,50	66	33	125	62,50	9	4,50			200	100
Staphylocoques pathogènes					189	100									189	100	189	94,50
Streptocoques fécaux					184	97,30	5	2,70	154	81,50	35	18,50					189	94,50
Germes sulfito- réducteurs (Cl. perfringens)					137	93,20	10	6,80	138	93,90	9	6,10					147	73,50
Pseudomonas aeruginosa					10	55,50	8	44,50	13	72,20	5	27,80					18	9

b) Expression des résultats

α) Ceux-ci sont exprimés :

- qualitativement par l'absence ou la présence de contaminants,
- quantitativement *en nombre d'organismes par millilitre de sirop analysé*, chaque micro-organisme donnant naissance théoriquement à une colonie sur milieu solide.

β) Nous avons défini ci-dessous des *classes de contamination*, dont les limites ont été choisies pour leur correspondance avec diverses normes proposées par certains auteurs pour d'autres formes pharmaceutiques (43) (67).

TABLEAU IX - DEFINITION DES CLASSES DE CONTAMINATION

Classes	Nombre de colonies dénombrées ou évaluées/ml
0	0
100	de 1 à 100
1000	de 101 à 1000
T.N.	> 1000

"> 1000" correspond dans notre étude, à un nombre de micro-organismes ou de colonies très élevé, incomptable (T.N. = très nombreuses). En effet, la limite possible et raisonnable de comptage est au maximum de 100 colonies par membrane filtrante ; si 0,1 ml de prise d'essai minimale donne 100 colonies, 1 ml du produit contient théoriquement 1000 micro-organismes.

Compte tenu du nombre important de sirops analysés, les résultats exprimés ont simplement pour but de donner une image du degré de pollution de cette forme galénique, sans vouloir prétendre atteindre une précision rigoureuse.

2°) Compte-rendu des résultats

Nous avons exposé ceux-ci de trois manières, sous forme de :

- tableaux généraux,
- tableaux détaillés en fonction du pH,
- courbes correspondantes.

a) Tableaux généraux

α) Tableau X page 90 à 100.

Chaque ligne de ce tableau résume qualitativement et quantitativement l'état de contamination de chaque sirop; leurs pH y figurent également.

β) Tableau XI page 101.

Il regroupe par classes de contamination les divers pourcentages des sirops examinés et répartis en fonction des groupes de germes recherchés.

γ) Tableau XII page 101.

Il réunit les pourcentages des sirops renfermant ou non des espèces particulières.

b) Tableaux détaillés

Ici, les résultats ont été exprimés en fonction du pH, les diverses répartitions des sirops étant traduites en pourcentages, afin de pallier l'inégalité des divers nombres de sirops contenus dans chaque tranche de pH.

α) Tableau XIII page 102.

Il comporte la distribution suivante :

- I - sirops *dits propres*, dans lesquels aucun germe n'a été décelé,
- II - sirops *avec germes saprophytes*,
- III - sirops *sans germes potentiellement pathogènes* ($\Sigma = I + II$)
- IV - sirops *avec germes potentiellement pathogènes*, ceci dans les conditions expérimentales et selon les conditions expérimentales et selon les critères définis précédemment,
- V - sirops classés par zones de pH.

β) Tableaux XIV à XVII pages 104, 106, 108 et 110.

Ils expriment la répartition de sirops par classes de contamination définies précédemment :

- pour les germes aérobies totaux (page 104)
- pour les germes anaérobies totaux (page 106)
- pour les champignons microscopiques totaux (page 108)
- pour les Pseudomonadacées (page 110)

Ont été ajoutés sur chaque tableau les pourcentages de sirops contaminés par le type de germe correspondant (présence), et la somme des pourcentages de sirops des classes 0 et 100 ($\Sigma 0 + 100$) qui correspond, comme nous le verrons, à des normes de contamination que nous proposerons comme valables.

γ) Tableau XVIII page 112

Il indique la répartition des sirops contenant des espèces particulières: *staphylocoques potentiellement pathogènes* et *Pseudomonas aeruginosa* (expression qualitative).

c) Courbes

Elles correspondent aux tableaux qui les précèdent. Elles portent en abscisses les pH et en ordonnées les pourcentages de sirops correspondants (Figures 3 à 8, pages 103, 105, 107, 109, 111 et 113).

Tableau X - G E R M E S T R O U V E S

Tableau général des résultats obtenus

(Nombre de germes/ml de sirop)

S I R O P S N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germes sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfringens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
1	13	11	0	0	0	0	0	0		2,90
2	38	21	0	0	0	0	0	0		7,35
3	3	2	0	0	0	0	0	0		2,80
4	2	1	0	0	0	0	0	0		5,70
5	7	12	44	0	0	0	0	0		4,30
6	1	0	0	0	0	0	0			2,90
7	4	26	1	0	0	0	0	0		2,80
8	*T.N.	73	9	0	2	0	0	0	+	8,40
9	T.N.	40	5	0	1	0	0	0	+	7,90
10	17	1	1	0	0	0	0	0		6

* T.N. = très nombreuses colonies > 1000

+ = présence

Tableau X (suite)

S I R O P N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germes sulfi- to- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
11	10	5	0	0	0	0	0	0		4,40
12	17	7	1	0	0	0	0	0		4,90
13	3	1	0	0	0	0	0	0		3,10
14	1	1	1	0	0	0	0	0		3,50
15	16	0	1	0	0	0	0	0		8,80
16	4	2	0	0	0	0	0	0		7,95
17	200	8	12	0	0	0	0	0		5,60
18	1	0	0	0	0	0	0	0		7,70
19	320	980	1	0	0	0	0	0		6,90
20	T.N.	11	3	0	0	0	0	0		5,90
21	3	4	1	0	0	0	0	0		8,10
22	4	2	0	0	0	0	0	0		7,40
23	1	0	0	0	0	0	0	0		2,60
24	36	55	0	0	0	0	0	0		1,90
25	3	1	0	0	0	0	0	0		2
26	1	0	1	0	0	0	0	0		3,90
27	360	130	60	0	5	0	0	0	+	7,70
28	72	27	1	0	0	0	0	0		7,70
29	12	2	100	0	0	0	0	0		6,40

Tableau X (suite)

S I R O P N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germes sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
30	20	6	1	0	0	0	0	0		3,60
31	700	860	130	0	0	0	0	0		5,80
32	58	9	1	0	0	0	0	0		5,05
33	T.N.	190	25	0	0	0	0	0		4,80
34	1	0	0	0	0	0	0	0		5,60
35	3	3	0	0	0	0	0	0		7,50
36	16	15	0	0	0	0	0	0		7,70
37	7	5	0	0	0	0	0	0		2,40
38	T.N.	T.N.	T.N.	0	1	0	0	0	0	4,90
39	22	64	2	0	0	0	0	0		6,90
40	1	1	0	0	0	0	0	0		5,60
41	T.N.	90	17	0	0	0	0	0		7,70
42	T.N.	0	17	0	0	0	0	0		5,90
43	8	5	2	0	0	0	0	0		5,70
44	1	1	0	0	0	0	0	0		1,95
45	1	1	0	0	0	0	0	0		1,75
46	19	0	4	0	0	0	0	0		8,80
47	4	0	0	0	0	0	0	0		2,10
48	T.N.	100	14	0	0	0	0	0		6,70

Tableau X (suite)

S I R O P N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germes sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
68	44	70	5	0	2	0	0	0	0	5,70
69	6	3	0	0	0	0	0	0		2,50
70	4	6	0	0	0	0	0	0		4,50
71	49	19	0	0	0	0	0	0		5,20
72	450	40	T.N.	0	5	0	0	0	0	5,80
73	1	0	0	0	0	0	0			4,10
74	1	1	0	0	0	0	0	0		3,80
75	0	0	0	0	0					7,40
76	100	16	30	0	0	0	0	0		6,10
77	1	1	0	0	0	0	0	0		1,10
78	25	18	0	0	0	0	0	0		9,90
79	6	1	0	0	0	0	0	0		9,40
80	T.N.	30	T.N.	0	0	0	0	0		7,45
81	T.N.	72	T.N.	0	0	0	0	0		7,45
82	1	0	0	0	0	0	0			6,90
83	12	21	0	0	0	0	0	0		6,45
84	4	4	1	0	0	0	0	0		5,40
85	500	40	1	0	3	0	0	0	+	6,30
86	49	32	2	0	0	0	0	0		5

Tableau X (suite)

S I R O P N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germes sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
87	1	0	1	0	0	0	0			2,80
88	3	0	0	0	0	0	0			5,50
89	4	3	1	0	0	0	0	0		5,60
90	0	0	0	0	0					5,40
91	0	0	0	0	0					6,40
92	9	10	0	0	0	0	0	0		6,90
93	3	2	0	0	0	0	0	0		3,30
94	1	0	0	0	0	0	0			4,40
95	55	11	1	0	0	0	0	0		5,30
96	0	1	0	0	0	0	0	0		7,30
97	19	24	0	0	1	0	0	0	0	4
98	1	0	0	0	0	0	0			7,10
99	81	1	0	0	4	0	0	0	0	5
100	360	90	0	0	0	0	0	0		8,40
101	92	32	12	0	0	0	0	0		8
102	1	18	0	0	0	0	0	0		6
103	80	120	0	0	0	0	0	0		7,40
104	1	1	0	0	0	0	0	0		4,50
105	0	0	0	0	0					3,10

Tableau X (suite)

S I R O P N	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germe sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
125	0	0	0	0	0					6,10
126	0	0	0	0	0					5,90
127	70	0	3	0	0	0	0			5,20
128	19	0	1	0	0	0	0			4,70
129	54	61	1	0	1	0	0	0	0	4,10
130	46	5	1	0	0	0	0	0		6,90
131	29	6	0	0	0	0	0	0		6,80
132	4	1	0	0	0	0	0	0		4,20
133	3	3	0	0	0	0	0	0		5,85
134	12	6	1	0	0	0	0	0		6,40
135	T.N.	T.N.	0	0	0	0	0	0		5,60
136	17	16	0	0	0	0	0	0		3,80
137	1	0	0	0	0	0	0			2,30
138	6	8	0	0	0	0	0	0		4,20
139	120	6	1	0	0	0	0	0		7,40
140	250	280	0	0	0	0	0	0		7
141	1	0	0	0	0	0	0			3,20
142	T.N.	15	0	0	2	0	0	0	+	6,20
143	3	1	1	0	0	0	0	0		4,90

Tableau X (suite)

S I R O P N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germes sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
144	1	0	0	0	0	0	0			3,20
145	1	0	0	0	0	0	0			6,70
146	400	350	0	0	0	0	0	0		5
147	T.N.	1000	6	0	0	0	0	0		4,30
148	5	19	2	0	0	0	0	0		7,20
149	1	0	0	0	0	0	0			3
150	1	0	0	0	0	0	0			3
151	11	35	0	0	0	0	0	0		3,50
152	3	2	0	0	0	0	0	0		6,80
153	2	3	0	0	0	0	0	0		5,10
154	0	1	0	0	0	0	0	0		3,10
155	15	32	2	0	0	0	0	0		5,70
156	14	3	0	0	0	0	0	0		4,10
157	4	6	0	0	0	0	0	0		9,70
158	0	1	0	0	0	0	0	0		6,40
159	13	6	2	0	0	0	0	0		7,20
160	8	6	0	0	0	0	0	0		5,45
161	0	0	0	0	0					6,80
162	0	0	0	0	0					7,30

Tableau X (suite)

S I R O P N°	GROUPES de GERMES					ESPECES PARTICULIERES				pH
	Aérobies totaux	Anaérobies totaux	Champignons microscopiques totaux	Entérobactériacées	Pseudomonadacées	Staphylocoques pathogènes	Streptocoques fécaux	Germe sulfito- réducteurs (<i>Clostridium perfrin- gens</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
182	6	1	0	0	0	0	0	0		2,95
183	0	2	1	0	0	0	0	0		6,50
184	7	0	0	0	0	0	0	0		8,10
185	30	14	T.N.	0	0	0	0	0		7,70
186	28	4	0	0	0	0	0	0		8,20
187	440	75	5	0	0	0	0	0		6
188	7	7	0	0	0	0	0	0		6,70
189	12	7	1	0	0	0	0	0		7,10
190	250	280	0	0	0	0	0	0		7,70
191	T.N.	280	5	0	0	0	0	0		6,70
192	4	5	0	0	0	0	0	0		5,40
193	1	1	0	0	0	0	0	0		4
194	17	13	0	0	0	0	0	0		5,70
195	T.N.	1000	6	0	0	0	0	0		5,90
196	17	9	0	0	0	0	0	0		7
197	6	5	1	0	1	0	0	0	0	4,10
198	15	2	T.N.	0	1	0	0	0	0	5,70
199	1	0	0	0	0	0	0	0		2,20
200	3	3	0	0	0	0	0	0		5,80

TABLEAU XI - POURCENTAGE DES SIROPS EXAMINES
REPARTITION EN FONCTION DES GERMES TROUVES

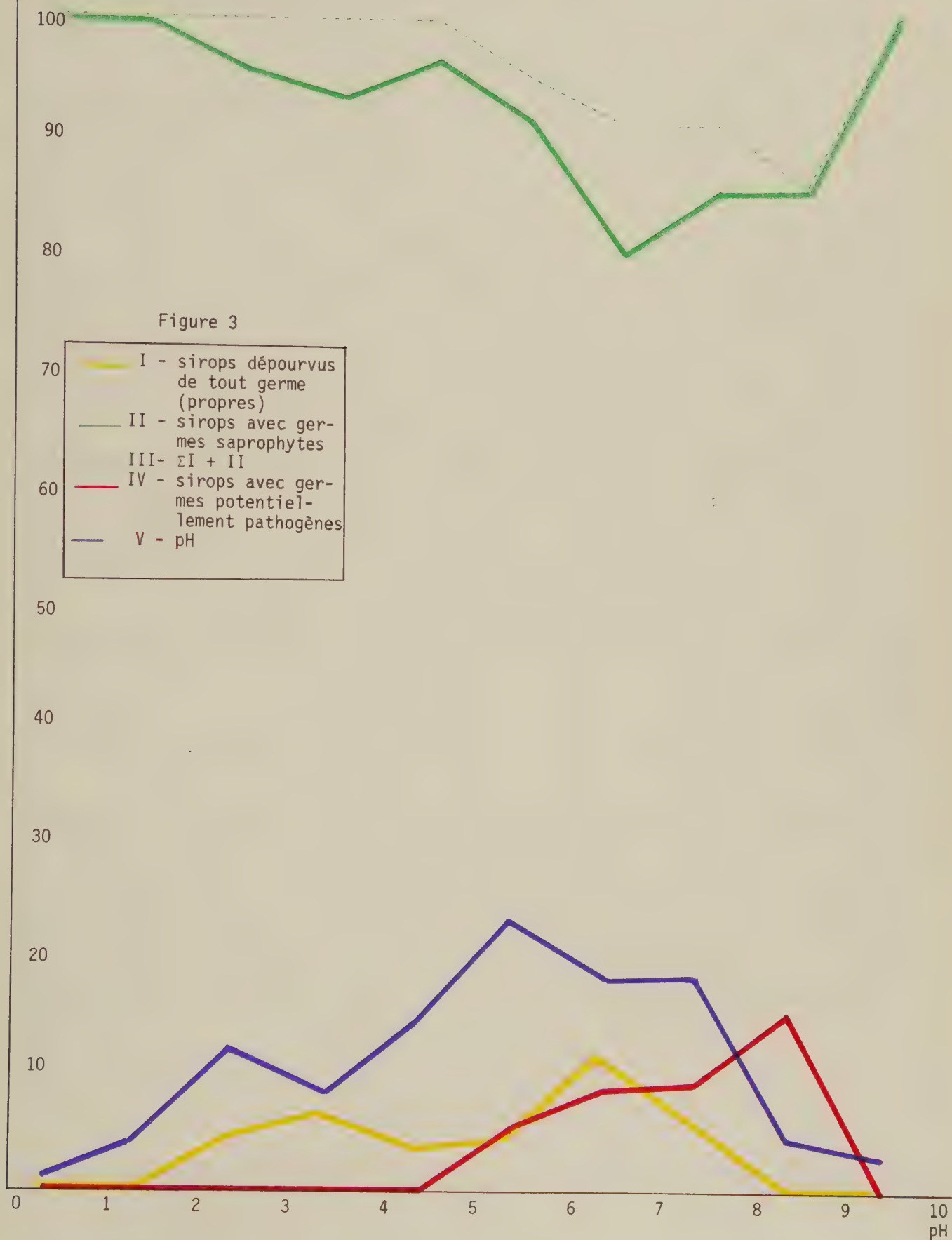
Germes \ Classes	0	100	1000	T.N.	$\Sigma 0 + 100$	Présence
Aérobies totaux	8	72,5	10,5	9	80,5	92
Anaérobies totaux	26,5	65,5	7	1	92	73,5
Champignons microscopiques totaux	63,5	31,5	0,5	4,5	95	36,5
Entérobactériacées	100	-	-	-	100	-
Pseudomonadacées	91	8,5	0,5	-	99,5	9

TABLEAU XII - POURCENTAGE DES SIROPS EXAMINES RENFERMANT DES ESPECES PARTICULIERES

GERMES	PRESENCE	ABSENCE
Entérobactéries	-	100
Streptocoques fécaux	-	100
Germes sulfito-réducteurs (<i>Cl. perfringens</i>)	-	100
Staphylocoques pathogènes	0,5	99,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	96

TABEAU XIII - REPARTITION DES SIROPS EN FONCTION DE LEUR pH ET DE LEUR ETAT DE CONTAMINATION

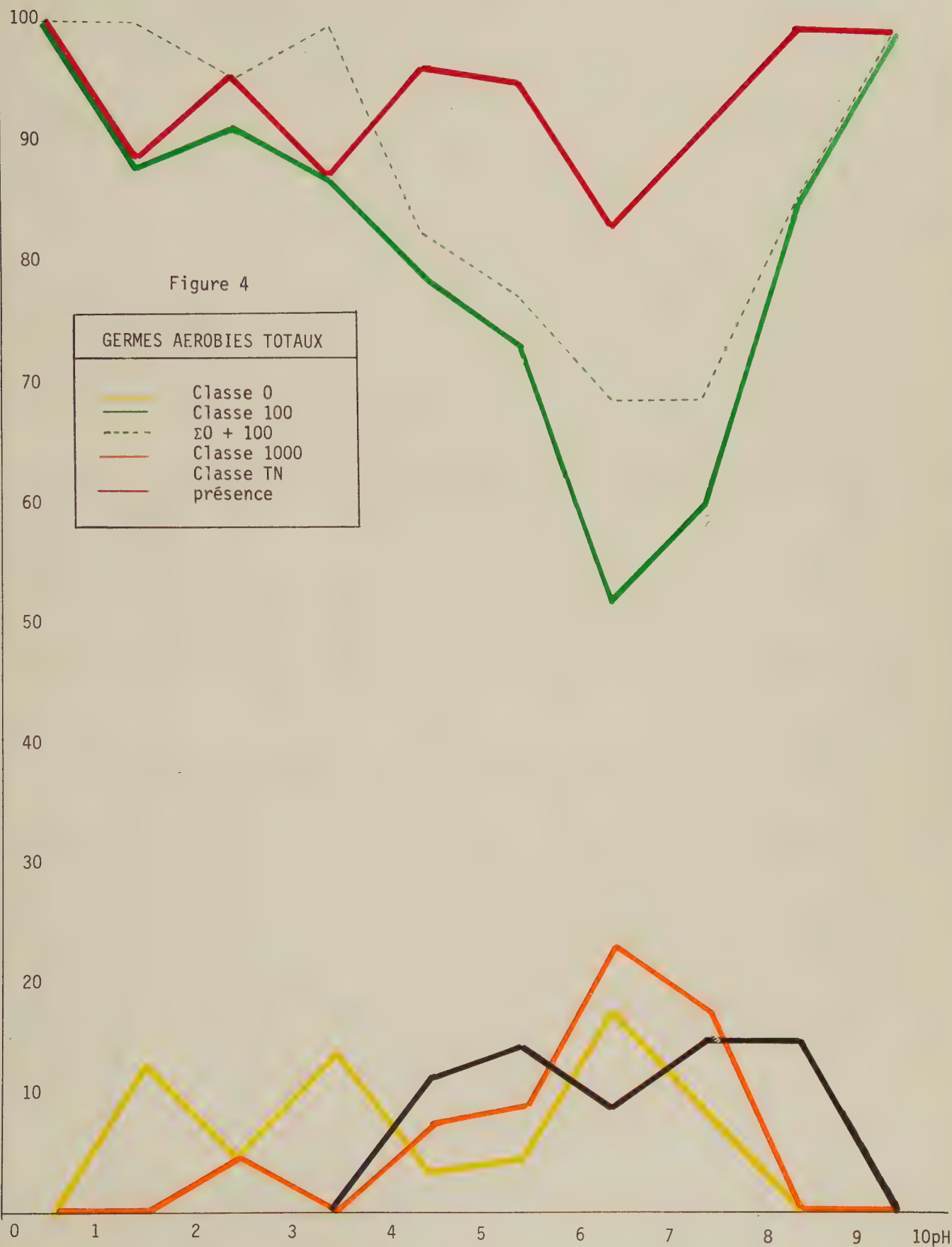
SIROPS →	I Sans germes (propres)		II Avec germes Saprophytes		III Σ I + II Sans germes potentiellement pathogènes		IV Avec germes potentiellement pathogènes		SIROPS ↓	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
pH ↓										
0 → 1			1	100	1	100			1	0,5
1 → 2			8	100	8	100			8	4
2 → 3	1	4,30	22	95,70	23	100			23	11,5
3 → 4	1	6,70	14	93,30	15	100			15	7,5
4 → 5	1	3,60	27	96,40	28	100			28	14
5 → 6	2	4,40	41	91,10	43	95,50	2	4,50	45	22,5
6 → 7	4	11,50	28	80	32	91,50	3	8,50	35	17,5
7 → 8	2	5,70	30	85,70	32	91,40	3	8,60	35	17,5
8 → 9			6	85,70	6	85,70	1	14,30	7	3,5
9 → 10			3	100	3	100			3	1,5
TOTAL :		5,50 %		90 %		95,50 %		4,50 %		100 %



GERMES AEROBIES TOTAUX

TABLEAU XIV

Classes → pH ↓ Sirops →	0		100		1000		T.N.		Σ 0 + 100		Présence		Total	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
0 → 1			1	100					1	100	1	100	1	0,50
1 → 2	1	12,50	7	87,50					8	100	7	87,50	8	4
2 → 3	1	4,35	21	91,30	1	4,35			22	95,65	22	95,65	23	11,50
3 → 4	2	13,30	13	86,70					15	100	13	86,70	15	7,50
4 → 5	1	3,60	22	78,60	2	7,10	3	10,70	23	82,20	27	96,40	28	14
5 → 6	2	4,50	33	73,30	4	8,90	6	13,30	35	77,80	43	95,50	45	22,50
6 → 7	6	17,20	18	51,40	8	22,80	3	8,60	24	68,60	29	82,80	35	17,50
7 → 8	3	8,60	21	60	6	17,10	5	14,30	24	68,60	32	91,40	35	17,50
8 → 9			6	85,70			1	14,30	6	85,70	7	100	7	3,50
9 → 10			3	100					3	100	3	100	3	1,50
TOTAL		8 %		72,5%		10,50 %		9 %		80,50%		92 %		100 %



GERMES ANAEROBIES TOTAUX

TABLEAU XV

Classes →		0		100		1000		T.N.		Σ 0 + 100		Présence		Total	
pH ↓	Sirops →	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
0	→ 1	1	100							1	100			1	0,50
1	→ 2	2	25	6	75					8	100	6	75	8	4
2	→ 3	15	65,20	8	34,80					23	100	8	34,80	23	11,50
3	→ 4	5	33,30	10	66,70					15	100	10	66,70	15	7,50
4	→ 5	4	14,30	20	71,40	3	10,70	1	3,60	24	85,70	24	85,70	28	14
5	→ 6	10	22,20	30	66,70	4	8,90	1	2,20	40	88,90	35	77,80	45	22,50
6	→ 7	8	22,90	24	68,50	3	8,60			32	91,40	27	77,10	35	17,50
7	→ 8	5	14,30	26	74,30	4	11,40			31	88,60	30	85,70	35	17,50
8	→ 9	3	42,80	4	57,20					7	100	4	57,20	7	3,50
9	→ 10			3	100					3	100	3	100	3	1,50
TOTAL			26,50%		65,50 %		7 %		1 %		92 %		73,50%		100 %

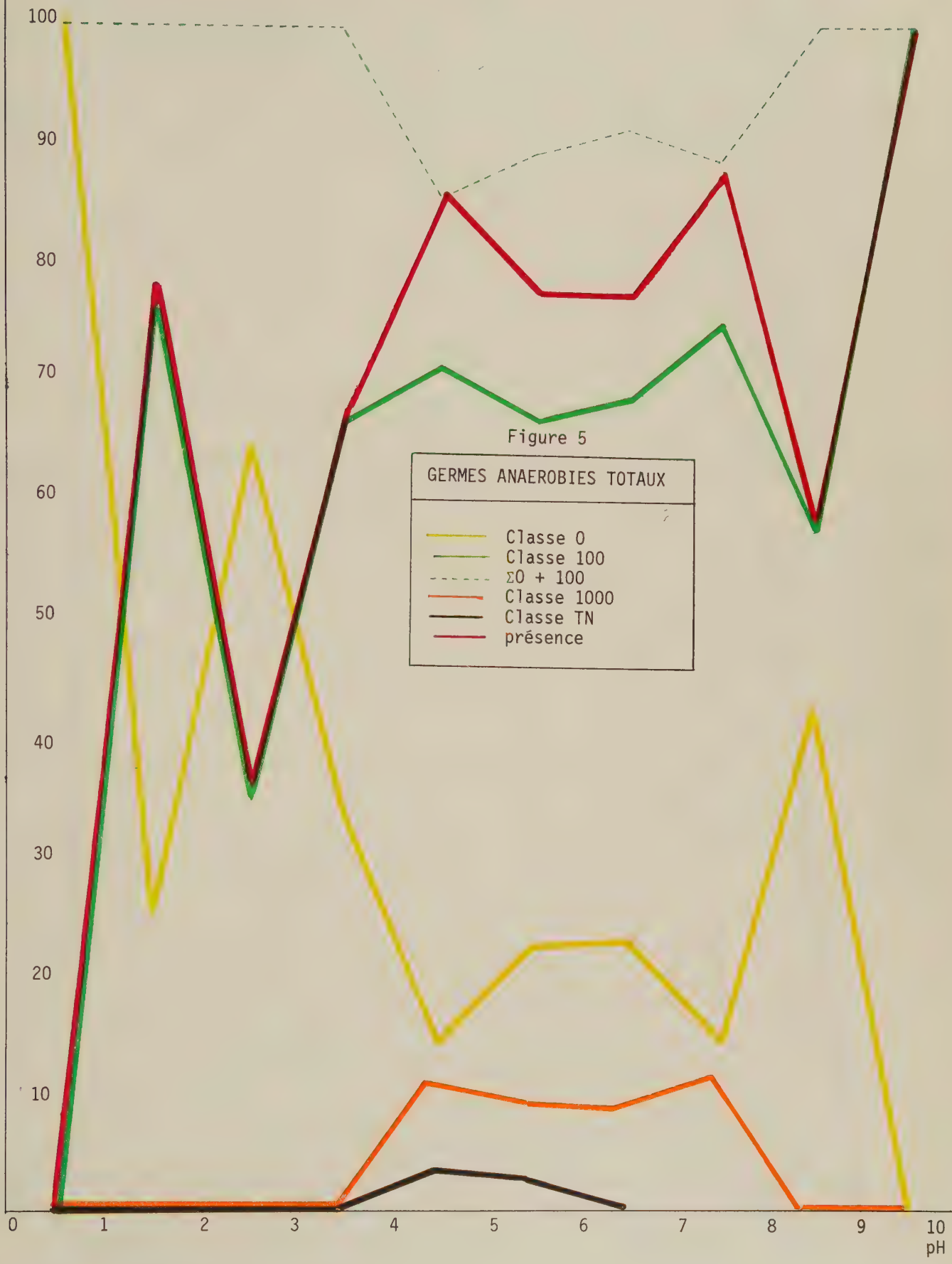
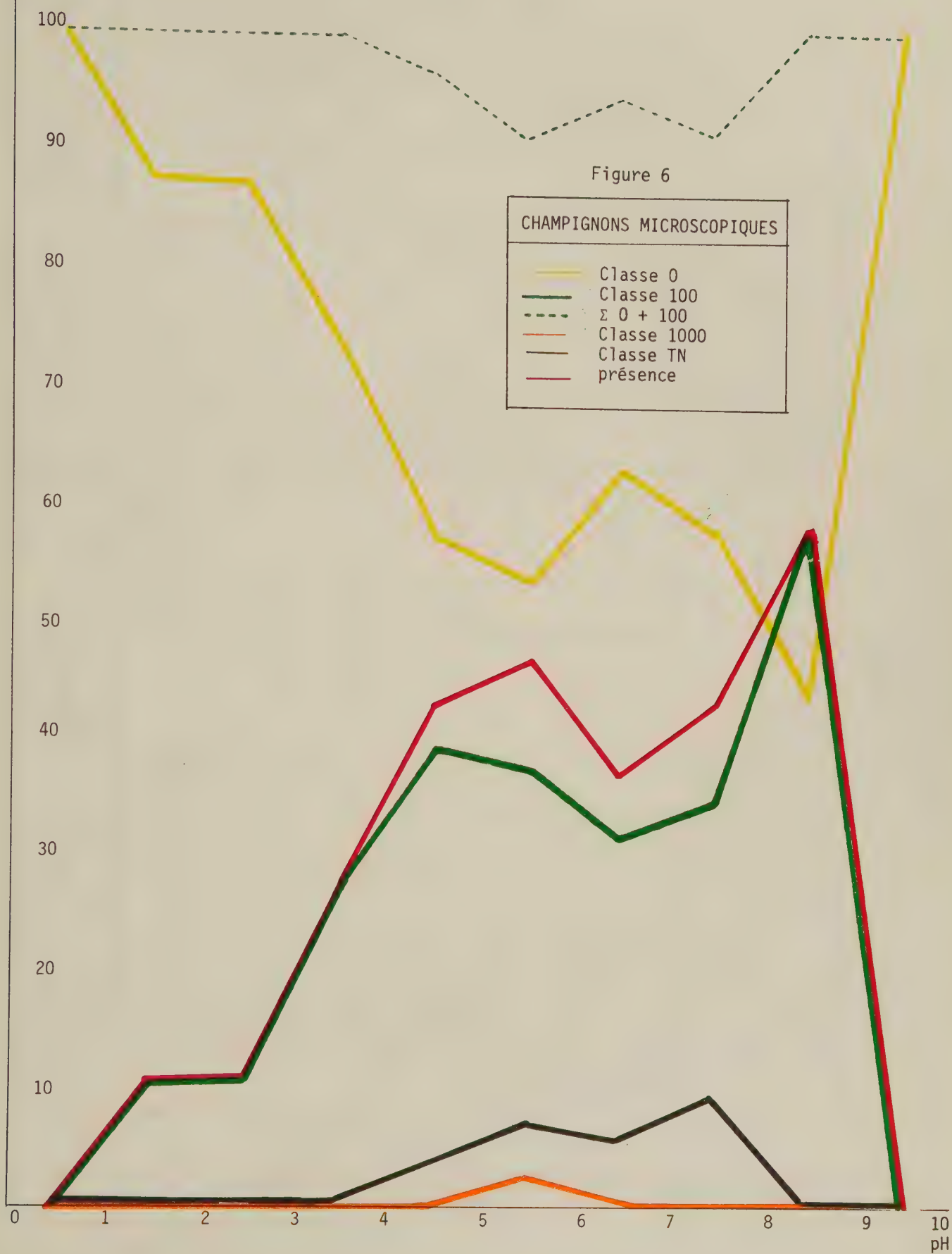


TABLEAU XVI

Classes → pH ↓ Sirops →	0		100		1000		T.N.		Σ 0 + 100		Présence		Total	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
0 → 1	1	100							1	100			1	0,50
1 → 2	7	87,50	1	12,50					8	100	1	12,50	8	4
2 → 3	20	87	3	13					23	100	3	13	23	11,50
3 → 4	11	73,30	4	26,70					15	100	4	26,70	15	7,50
4 → 5	16	57,10	11	39,30			1	3,60	27	96,40	12	42,90	28	14
5 → 6	24	53,30	17	37,80	1	2,20	3	6,70	41	91,10	21	46,70	45	22,50
6 → 7	22	62,90	11	31,40			2	5,70	33	94,30	13	37,10	35	17,50
7 → 8	20	57,10	12	34,30			3	8,60	32	91,40	15	42,90	35	17,50
8 → 9	3	42,90	4	57,10					7	100	4	57,10	7	3,50
9 → 10	3	100							3	100			3	1,50
TOTAL		63,50%		31,50 %		0,50 %		4,50 %		95 %		36,50 %		100 %



PSEUDOMONADACEES

TABLEAU XVII

Classes → pH ↓ Sirops →	0		100		1000		T.N.		Σ 0 + 100		Présence		Total	
	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%
0 → 1	1	100							1	100			1	0,50
1 → 2	8	100							8	100			8	4
2 → 3	23	100							23	100			23	11,50
3 → 4	14	93,30	1	6,70					15	100	1	6,70	15	7,50
4 → 5	23	82,10	5	17,90					28	100	5	17,90	28	14
5 → 6	41	91,10	3	6,70	1	2,20			44	97,80	4	8,90	45	22,50
6 → 7	32	91,40	3	8,60					35	100	3	8,60	35	17,50
7 → 8	31	88,60	4	11,40					35	100	4	11,40	35	17,50
8 → 9	6	85,70	1	14,30					7	100	1	14,30	7	3,50
9 → 10	3	100							3	100			3	1,50
TOTAL		91 %		8,50 %		0,50 %				99,50%		9 %		100 %

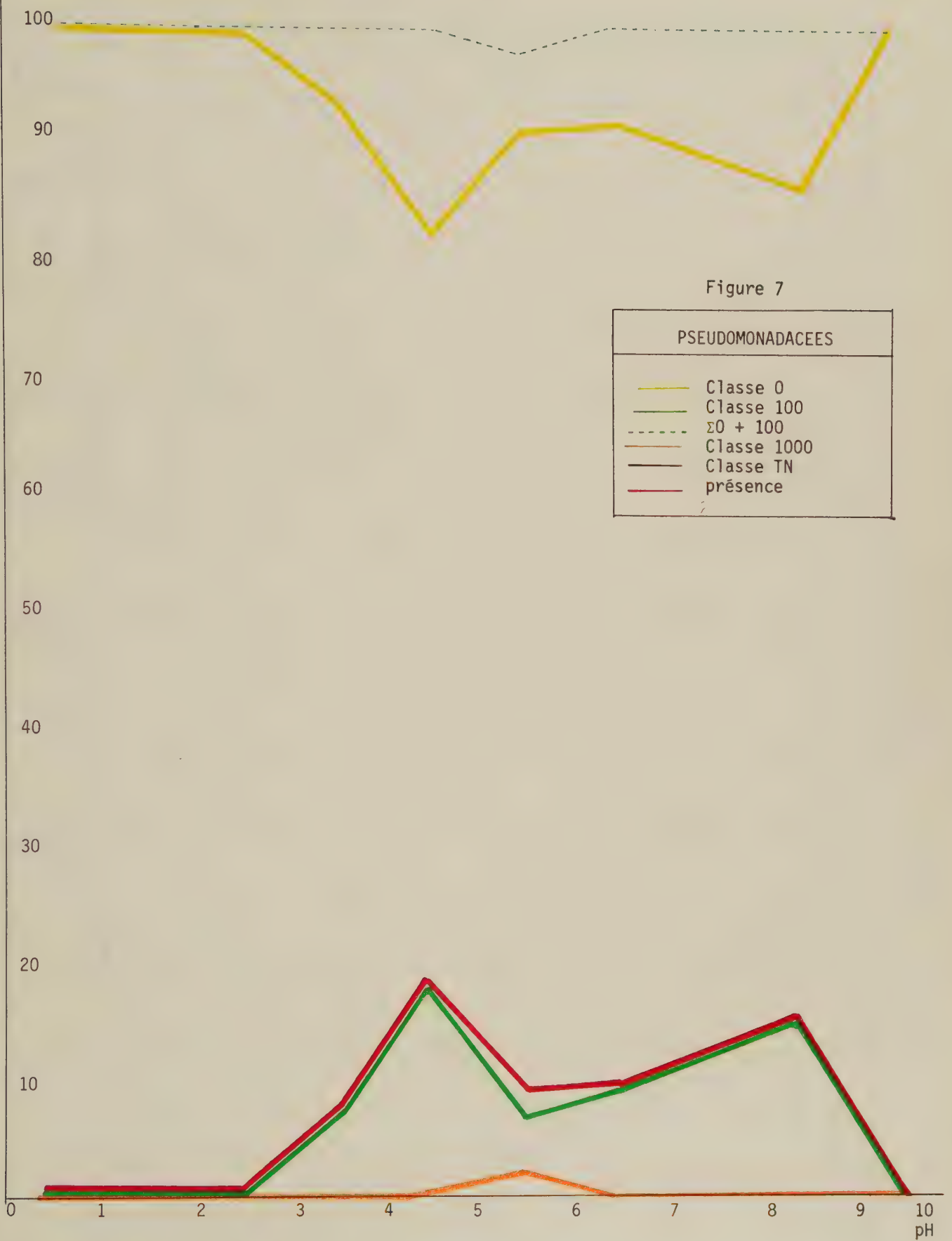
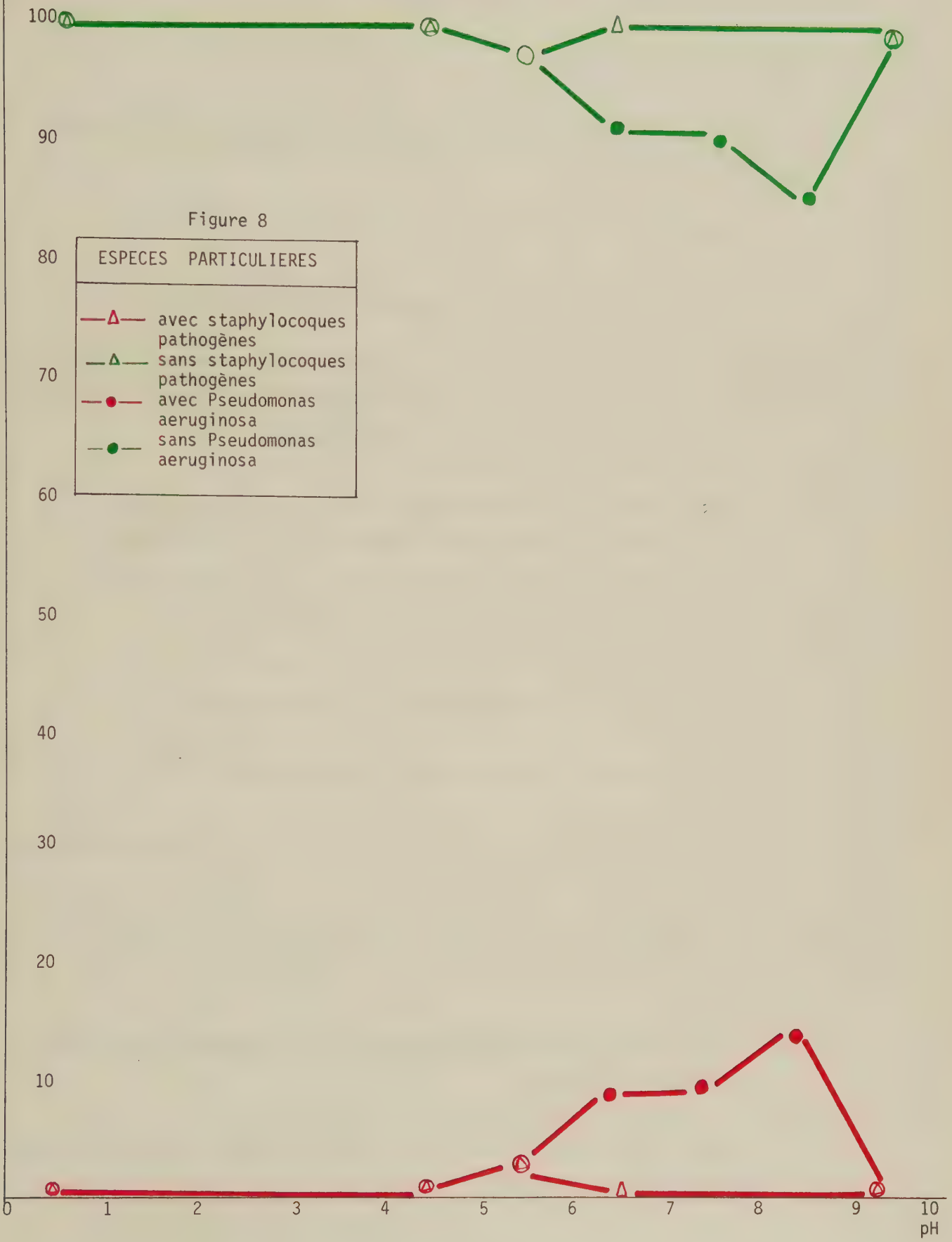


TABLEAU XVIII

GERMES RECHERCHES → pH ↓	STAPHYLOCOQUES PATHOGENES				PSEUDOMONAS AERUGINOSA				TOTAL DES SIROPS	
	Présence		Absence		Présence		Absence		Nombre	%
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%		
0 → 1			1	100			1	100	1	0,50
1 → 2			8	100			8	100	8	4
2 → 3			23	100			23	100	23	11,50
3 → 4			15	100			15	100	15	7,50
4 → 5			28	100			28	100	28	14
5 → 6	1	2,20	44	97,80	1	2,20	44	97,80	45	22,50
6 → 7			35	100	3	8,60	32	91,40	35	17,50
7 → 8			35	100	3	8,60	32	91,40	35	17,50
8 → 9			7	100	1	14,30	6	85,70	7	3,50
9 → 10			3	100			3	100	3	1,50
TOTAL		0,50%		99,50%		4%		96%		100%



IV - INTERPRETATION DES RESULTATS ET SUGGESTIONS

1°) Considérations générales

a) Ces résultats n'ont de signification qu'en fonction de la méthode décrite et utilisée.

b) Sur 200 sirops

- 95,5 % *ne contiennent pas de germes potentiellement pathogènes* et seulement 4,5 % en présentent,
- 90 % *ne renferment que des germes saprophytes* ; c'est un pourcentage qui pourrait facilement être amélioré,
- 5,5 % (soit 11 sirops) *ne contiennent aucun germe* (sirops dits propres). C'est un petit nombre, mais il est significatif. Ceci prouve qu'il est possible d'obtenir des sirops d'une propreté microbienne optimale, sans prétendre en affirmer la réelle stérilité :

Sur ces 11 échantillons microbiologiquement propres :

- 4 ne portent la mention d'aucun conservateur,
- 1 renferme un mélange d'esters de l'acide parahydroxybenzoïque,
- 6 contiennent du benzoate de sodium ; contrairement à ce qu'avancent certains auteurs (91), ce produit n'est pas actif contre les germes,
- 6 ont dans leur composition une forte proportion de produits à base de plantes.

Quant à leurs pH, ils se situent pour la plupart, dans les zones de croissance habituelles des germes.

Aucune explication valable ne peut donc être avancée pour expliquer la très haute qualité microbiologique de ces 11 sirops, si ce n'est les conditions de fabrication.

2°) Interprétation des résultats par groupes de germes

a) Germes aérobies totaux

- 92 % des sirops en contiennent, mais 72,5 % appartiennent à la classe 100 et 9 % seulement sont très pollués (classe T.N.).
- Les classes 0 et 100 groupent 80,5 % du nombre total des sirops, pourcentage appréciable d'échantillons pouvant être considérés comme peu contaminés.

Précisons bien que si, pour des commodités d'expression, nous avons groupé les classes 0 et 100, celles-ci ne sont nullement comparables entre elles, puisque la première correspond à l'absence totale de germes, contrairement à la seconde.

b) Germes anaérobies totaux

- 92 % des sirops renferment moins de 100 germes au ml (26,5 % de la classe 0 et 65,5 % de la classe 100),
- 1 % seulement est très pollué (classe T.N.), ce qui est peu important.

c) Champignons microscopiques totaux

Les sirops étudiés, bien que milieux favorables au développement

de ce type de germes, en renferment relativement peu :

- 36,5 % en contiennent, mais 31,5 % appartiennent à la classe 100 et 4,5 % sont très pollués (classe T.N.).
- Les classes 0 et 100 groupent 95 % des échantillons analysés, pourcentage très élevé de sirops dont la contamination par ce type de germes peut être considéré comme faible.

d) Entérobactériacées

Même avec le milieu d'enrichissement utilisé, aucune entérobactérie n'a été décelée dans les 200 sirops analysés. La prise d'essai a été de 5 ml sur 185 sirops, 10 ml sur 15 sirops, et cette recherche a été effectuée 2 fois pour 62,5 % des sirops. On peut dire qu'il y a absence d'entérobactéries dans 5 ml de sirop, le contrôle de fertilité, positif, donnant par ailleurs une certaine sécurité à l'essai.

e) Pseudomonadacées

La contamination par cette famille de germes est relativement faible, 9 % en renferment, dont 8,5 % appartiennent à la classe 100.

Aucun sirop ne se trouve dans la classe T.N.

3°) Espèces particulières

Les résultats résumés page 101 (tableau XII) montrent que :

- a) 4 % seulement contiennent des *Pseudomonas aeruginosa*,
- b) 0,5 % (soit un seul échantillon) renferme des staphylocoques reconnus pathogènes d'après les critères retenus : en effet, sur 200 sirops, 23 ont été cultivés en milieu hypersalé et 9 d'entre eux ont attaqué le mannitol contenu dans le milieu de CHAPMAN. Les activités enzymatiques des germes de ces 9 sirops sont résumées dans le tableau XIX page 117. Seul le sirop n°119 semble renfermer un staphylocoque doué d'activité enzymatique

Tableau XIX - ACTIVITE ENZYMATIQUE DES STAPHYLOCOQUES ISOLÉS DES SIROPS CI-DESSOUS

SIROP	CHAPMAN (Mannitol +)	COAGULASE	D.N. ASE	PHOSPHATASE	ANAEROBIOSE	CONCLUSIONS
n° 29	+	-	-	Faible activité	-	Non pathogène
n° 38	+	-	-	-	-	Non pathogène
n° 64	+	-	-	-	-	Non pathogène
n° 85	+	-	-	-	+	Non pathogène
n° 92	+	-	-	Faible activité	+	Non pathogène
n° 119	+	-	+	+	+	Pathogène
n° 122	+	-	-	Faible activité	-	Non pathogène
n° 179	+	-	-	-	+	Non pathogène
n° 191	+	-	-	-	-	Non pathogène

appréciable (D.N. ase et phosphatase), vraisemblablement due à la présence de staphylocoques pouvant engendrer des symptômes d'intoxication, bien que *coagulase négatifs*. Ce sirop renferme du paraoxybenzoate de méthyle (0,1 %), mais aussi une forte proportion de sirop de fruits. Cependant, beaucoup d'autres sirops sont à base d'extraits végétaux, sans pour autant contenir forcément des staphylocoques pathogènes. Comme nous l'avons vu, *les staphylocoques potentiellement pathogènes* sont très répandus et réussissent souvent à se développer dans les milieux où ils se trouvent. Cependant, le saccharose, élément essentiel dans la fabrication des sirops, semble protéger cette forme galénique d'une pollution par staphylocoques pathogènes, qui une fois présents perdraient à la longue de leur virulence.

- c) Il n'a été décelé ni *Clostridium perfringens*, principal représentant des germes sulfito-réducteurs, ni streptocoques fécaux.

o o o o o o o

Il découle de cette étude que la pollution microbienne des sirops est quantitativement et qualitativement peu importante, excepté les quelques cas de contamination par *Pseudomonas aeruginosa* et celui par Staphylocoques pathogènes.

o o o o o o o

Comment expliquer cet état microbiologique des sirops ? Il est naturellement très difficile d'éclaircir complètement la question : beaucoup d'éléments nous sont inconnus (conditions de fabrication, le ou les noms des conservateurs pour certains sirops, ...). Peut-être serait-il aussi intéressant d'examiner les résultats obtenus à la lumière de certains facteurs influant sur la propreté microbiologique finale des sirops. Les plus importants, à notre connaissance, sont le pH et les conservateurs.

4°) Interprétation des résultats en fonction du pH des sirops

Tout d'abord en examinant la courbe des pH, figure 3 page 103, nous remarquons que *la majorité des pH des 200 sirops se situe*

dans une zone comprise entre 2 et 8 (90,5 %) avec une zone de fréquence maximale entre 5 et 6. Celle-ci comprend la zone de croissance favorable aux germes. Apparemment donc, le pH pourrait avoir une influence néfaste sur l'état de pollution microbienne des sirops ; cependant, nous pouvons faire les quelques remarques suivantes :

- la majorité des *sirops peu pollués*, quel que soit le type de germes, se situe dans la zone des pH favorables au développement microbien ;
- les sirops à *pH acides extrêmes* semblent mieux protégés que ceux à pH alcalins. Ceci était prévisible. Mais ce phénomène paraît cependant moins prononcé pour les anaérobies ;
- les *Pseudomonas aeruginosa* rencontrés dans certains sirops se développeraient bien en milieu alcalin ;
- à noter que le pH du sirop contenant des staphylocoques potentiellement pathogènes (5,5), se situe dans une zone de pH favorable à la croissance de ces germes.

5°) Efficacité des principaux conservateurs et produits apparentés annoncés

Il était intéressant d'établir le rapport pouvant exister entre les conservateurs et les degrés de pollution retrouvés au cours de nos essais. C'est ce qui a été fait dans les tableaux et histogrammes des pages 122 à 137.

Nous pouvons remarquer les points suivants :

- *esters de l'acide para-hydroxybenzoïque* : 32,5 % des sirops en portaient la mention ; la pollution semble faible en présence de ces conservateurs ; en particulier les *champignons microscopiques* et les *Pseudomonadacées* sont peu fréquents (tableau XX, page 122 et figure 9 page 123). Cependant, le seul sirop pollué par des staphylocoques potentiellement pathogènes renferme des esters de l'acide para-hydroxybenzoïque, qui sont également présents dans un échantillon contaminé par *Pseudomonas aeruginosa*.

- *acide benzoïque* : le groupe de sirops en contenant ne présente pas une contamination importante particulière. Il n'y a pas d'échantillon renfermant des Pseudomonadacées (tableau XXI page 124 et figure 10 page 125).
- *benzoate de sodium* : la pollution est inégale mais plus élevée qu'avec les esters de l'acide para-hydroxybenzoïque. Les sirops contenant beaucoup de germes aérobies et de champignons microscopiques sont nombreux (respectivement 14,05 % et 4,7 % : classe T.N.). Il semble donc que le benzoate de sodium ne protège pas efficacement cette forme galénique contre les pollutions microbiennes (tableau XXII page 126 et figure 11 page 127) contrairement à l'avis de certains auteurs (91), qui le préconisent pour la protection des sirops contre les micro-organismes.
- *glycérol* : d'après les résultats obtenus, les pollutions sont très élevées (tableau XXIII page 128 et figure 12 page 129 41,7 % des échantillons appartiennent à la classe T.N. pour les germes aérobies et 33,3 % à la classe 1000 pour les germes anaérobies).

Le glycérol jouerait donc plutôt le rôle d'un aliment dans le cas présent, bien que certains auteurs lui attribuent une action antiseptique, à hautes concentrations, il est vrai.

- *acides citrique et phosphorique* : peu de sirops en contiennent : 3 % (tableau XXIV et XXV pages 130 et 132, figures 13 et 14 pages 131 et 133) et de ce fait le nombre d'échantillons est trop peu représentatif pour que l'on puisse en tirer une conclusion valable.
- *gaiacol et ses dérivés* : ce groupe de produits ne semble absolument pas protéger la forme sirop. Il y a beaucoup de germes aérobies, anaérobies et champignons microscopiques (tableau XXVI page 134 et figure 15 page 135).
- *huiles essentielles et leurs dérivés* : ici encore la protection ne semble pas particulièrement efficace et beaucoup de bactéries aérobies peuvent être mises en évidence (tableau XXVII page 136 et figure 16 page 137).

Tableau XX - ESTERS DE L'ACIDE PARAHYDROXY BENZOIQUE

CLASSES		0		100		1000		T.N.		Présence		NOMBRE DE SIROPS ↓
Germes recherchés ↓	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%		
Aérobies totaux	4	6,15	56	86,15	1	1,50	4	6,20	61	93,85	65	
Anaérobies totaux	20	30,80	41	63,10	3	4,60	1	1,50	45	69,20	65	
Champignons microscopiques totaux	44	67,70	20	30,80			1	1,50	21	32,30	65	
Pseudomonadacées	61	93,80	4	6,20					4	6,20	65	
ESPECES PARTICULIERES												
Absence		Présence		PSEUDOMONAS AERUGINOSA →								
Nbre	%	Nbre	%									
64	98,50	1	1,50									

% échantillons de sirops

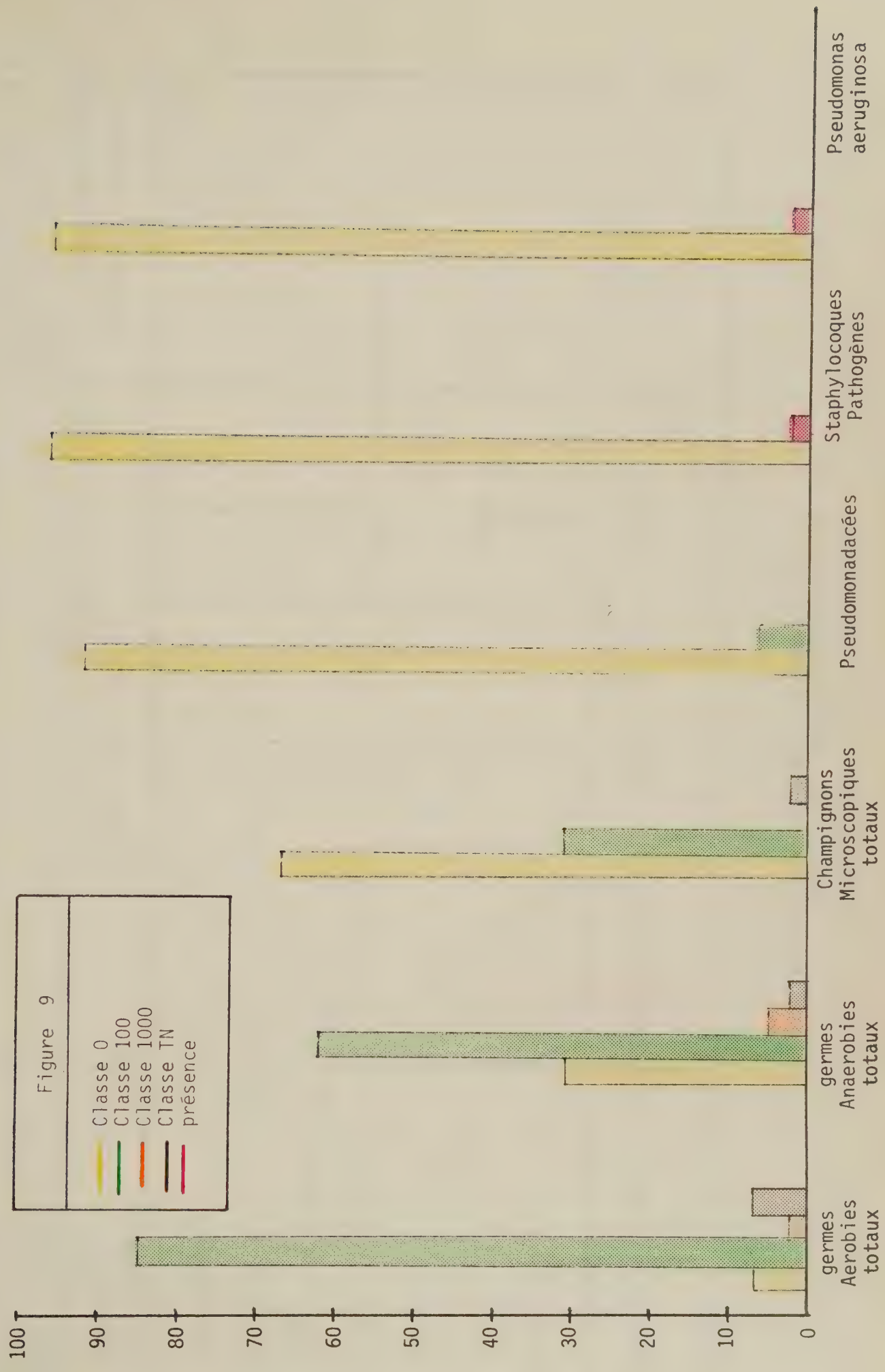


Tableau XXI - ACIDE BENZOIQUE

CLASSES →		0		100		1000		T.N.		Présence		NOMBRE DE SIROPS ↓					
Germes recherchés ↓		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%						
Aérobies totaux				8	100					8	100	8					
Anaérobies totaux		3	37,50	5	62,50					5	62,50	8					
Champignons microscopiques totaux		5	62,50	3	37,50					3	37,50	8					
Pseudomonadacées		8	100									8					
Absence		Présence		ESPECES PARTICULIERES										Absence		Présence	
Nbre	%	Nbre	%											Nbre	%	Nbre	%
8	100	0	0	← STAPHYLOCOQUES PATHOGENES PSEUDOMONAS AERUGINOSA →										8	100	0	0

% échantillons de sirops

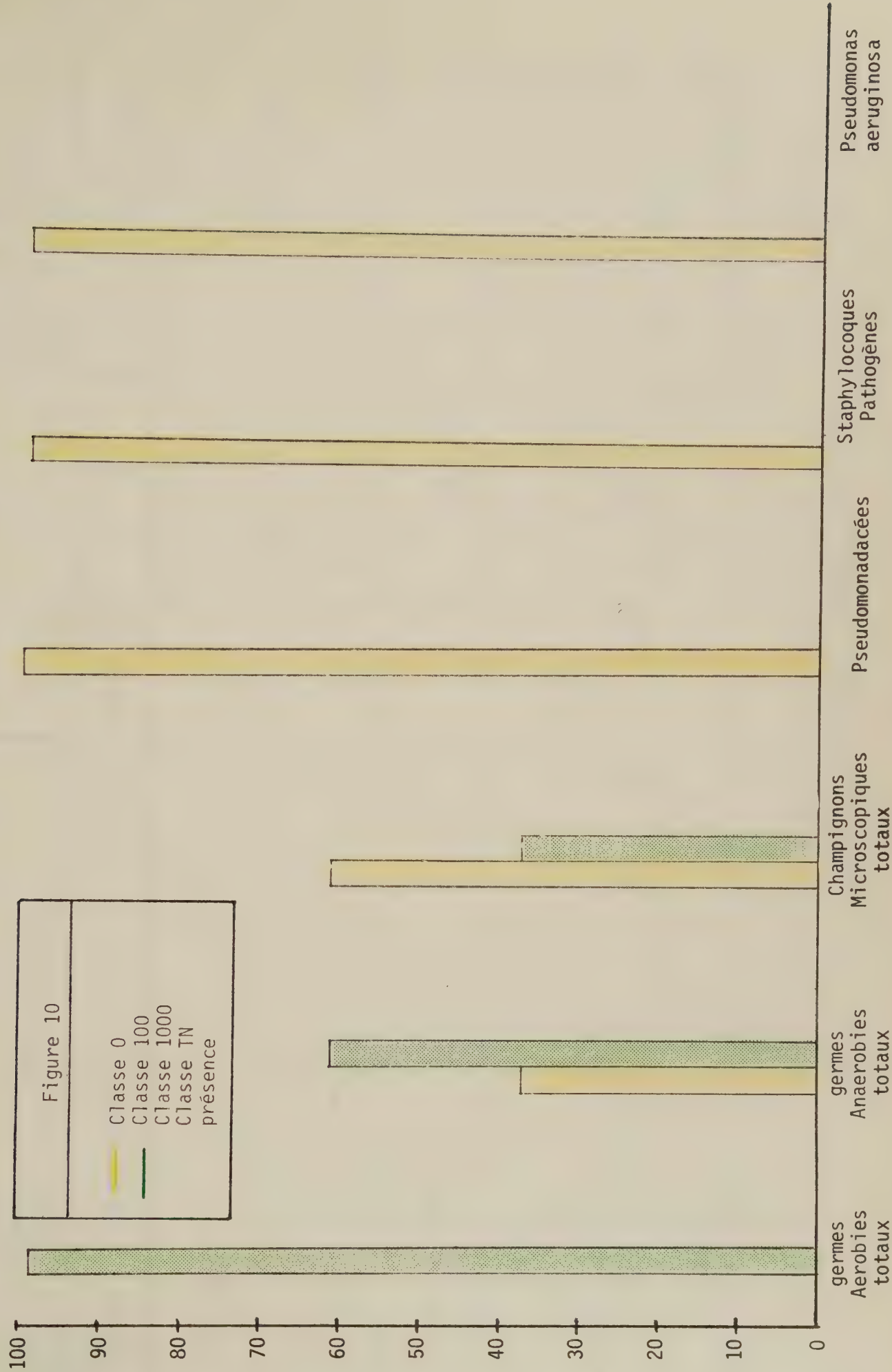


Tableau XXII - BENZOATE DE SODIUM

CLASSES →				0				100				1000				T.N.				Présence				NOMBRE DE SIROPS ↓			
Germes recherchés ↓				Nbre		%		Nbre		%		Nbre		%		Nbre		%		Nbre		%					
				Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%												
Aérobies totaux				9		14,10		34		53,10		12		18,75		9		14,05		55		85,90	64				
Anaérobies totaux				15		23,40		42		65,60		7		11						49		76,60	64				
Champignons microscopiques totaux				30		46,90		30		46,90		1		1,50		3		4,70		34		53,10	64				
Pseudomonadacées				58		90,60		6		9,40									6		9,40	64					
Absence		Présence		ESPECES PARTICULIERES																				Absence		Présence	
Nbre	%	Nbre	%	PSEUDOMONAS AERUGINOSA →																Nbre	%	Nbre	%				
64	100	0	0	← STAPHYLOCOQUES PATHOGENES																59	92,20	5	7,80				

% échantillons de sirops

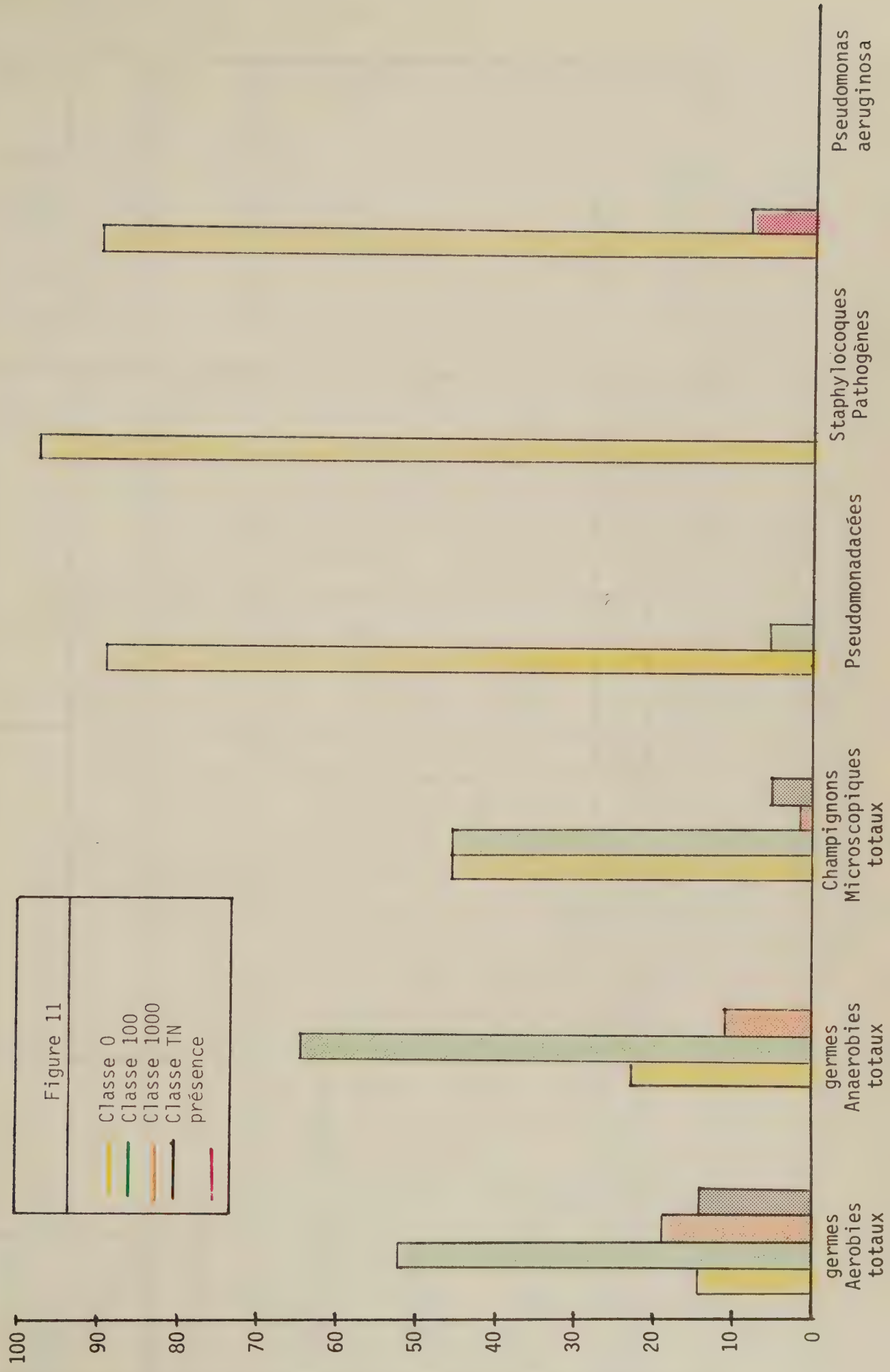
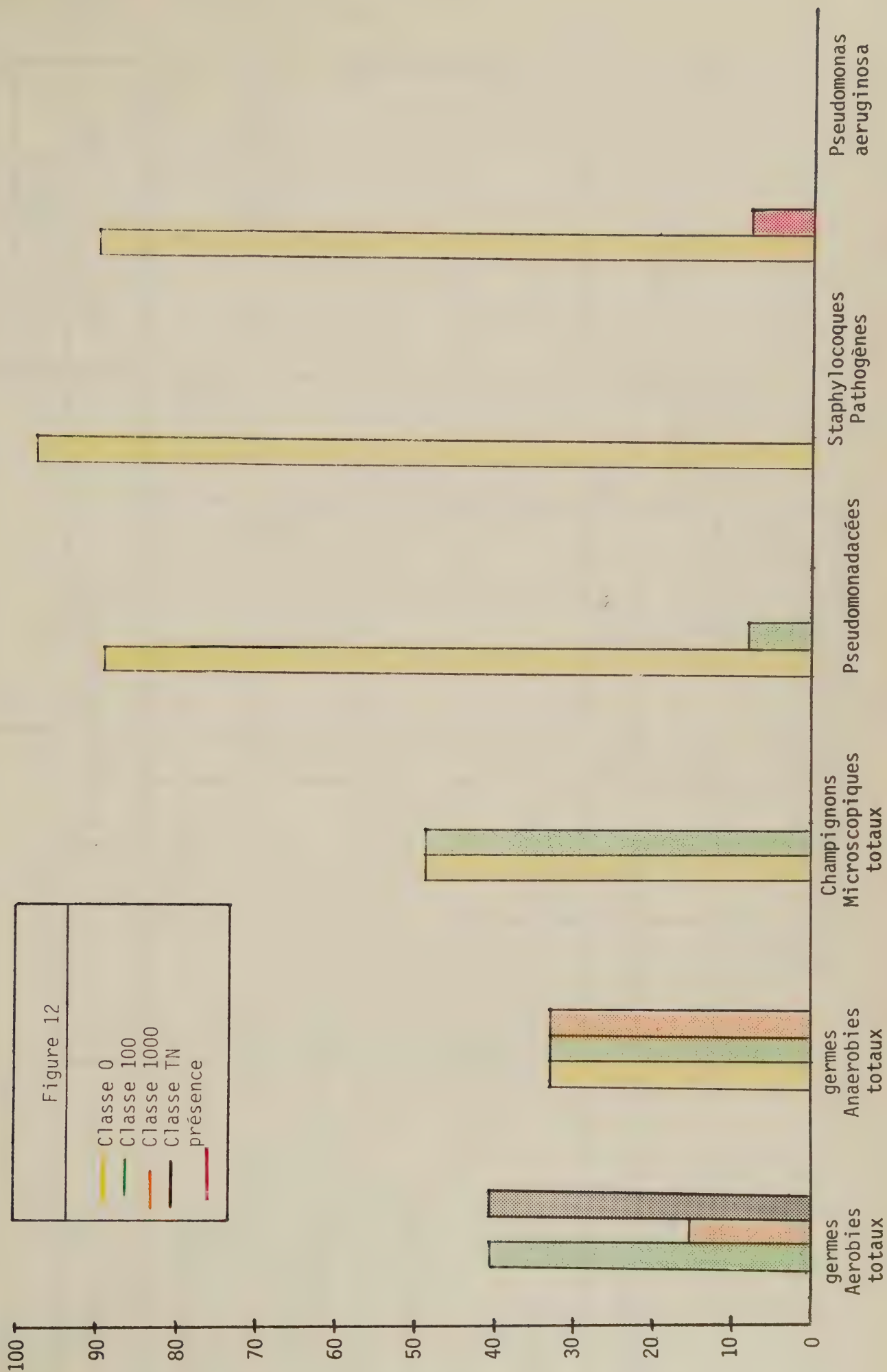


TABLEAU XXIII - GLYCEROL

Classes →		0			100			1000			T.N.			Présence			NOMBRE DE SIROPS ↓				
GERMES RECHERCHES ↓		Nbre	%		Nbre	%		Nbre	%		Nbre	%		Nbre	%						
Aérobies totaux					5	41,70		2	16,60		5	41,70		12	100		12				
Anaérobies totaux		4	33,33		4	33,33		4	33,33					8	66,70		12				
Champignons microscopiques totaux		6	50		6	50								6	50		12				
Pseudomonadacées		11	91,70		1	8,30								1	8,30		12				
Absence		Présence		ESPECES PARTICULIERES														Absence		Présence	
Nbre	%	Nbre	%															Nbre	%	Nbre	%
12	100	0	0	← STAPHYLOCOQUES PATHOGENES PSEUDOMONAS AERUGINOSA →														11	91,70	1	8,30

GLYCEROL

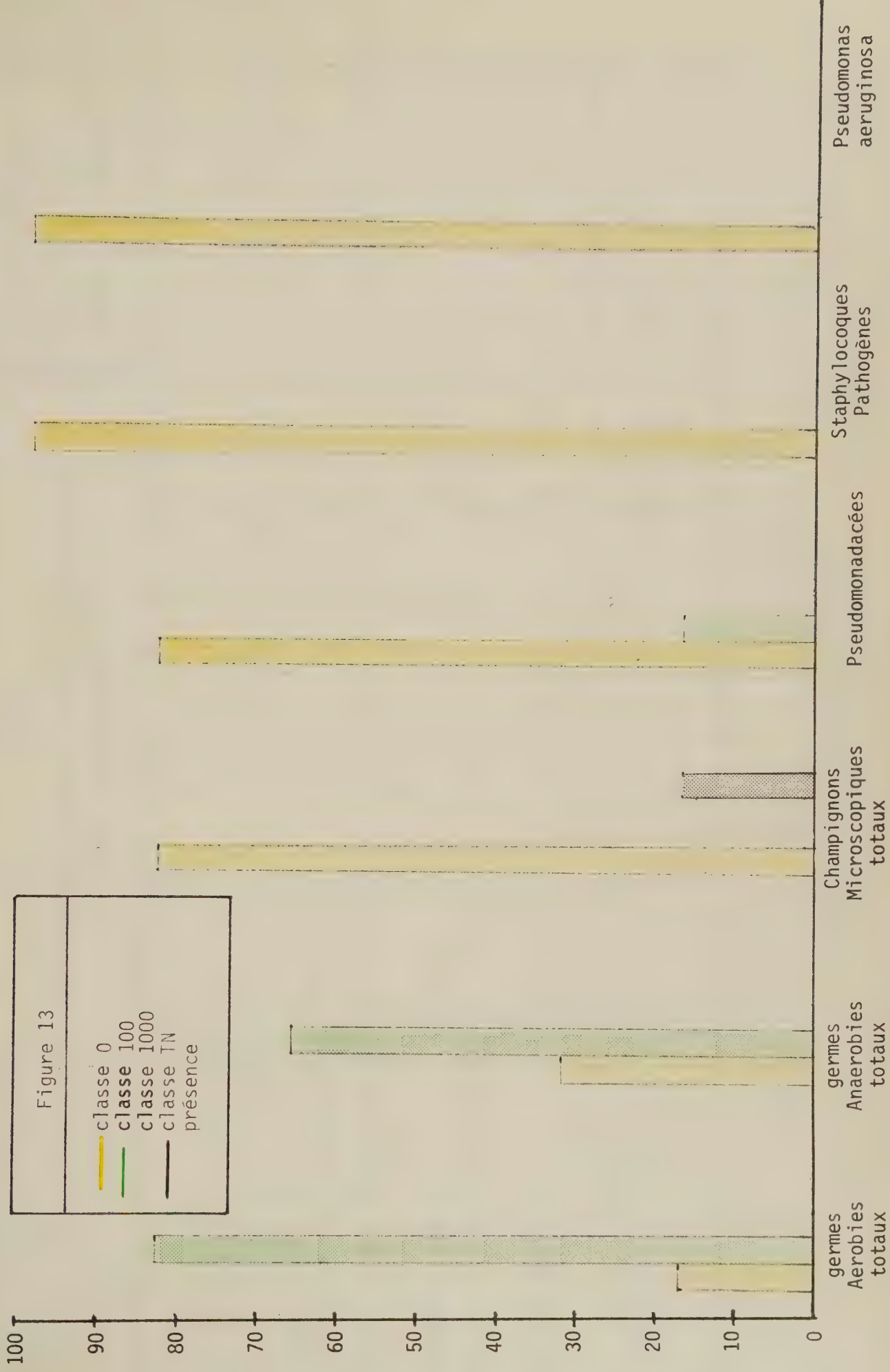
% échantillons de sirops



TABEAU XXIV - ACIDE CITRIQUE

Classes →		0		100		1000		T.N.		Présence		NOMBRE DE SIROPS	
GERMES RECHERCHES		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	+	
Aérobies totaux		1	16,70	5	83,30					5	83,30	6	
Anaérobies totaux		2	33,30	4	66,70					4	66,70	6	
Champignons microscopiques totaux		5	83,30					1	16,70	1	16,70	6	
Pseudomonadacées		5	83,30	1	16,70					1	16,70	6	
		ESPECES PARTICULIERES											
Absence		Présence											
Nbre	%	Nbre	%										
6	100	0	0	← STAPHYLOCOQUES PATHOGENES		PSEUDOMONAS AERUGINOSA →							

% échantillons de sirops



CLASSES →		0		100		1000		T.N.		Présence		NOMBRE DE SIROPS ↓			
Germes recherchés ↓		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%				
Aérobies totaux		2	33,30	3	50	1	16,70			4	66,70	6			
Anaérobies totaux		1	16,70	5	83,30					5	83,30	6			
Champignons microscopiques totaux		5	83,30	1	16,70					1	16,70	6			
Pseudomonadacées		6	100									6			
Absence		Présence		ESPECES PARTICULIERES								Absence		Présence	
Nbre	%	Nbre	%	←STAPHYLOCOQUES PATHOGENES				PSEUDOMONAS AERUGINOSA →				Nbre	%	Nbre	%
6	100	0	0									6	100	0	0

% échantillons de sirops

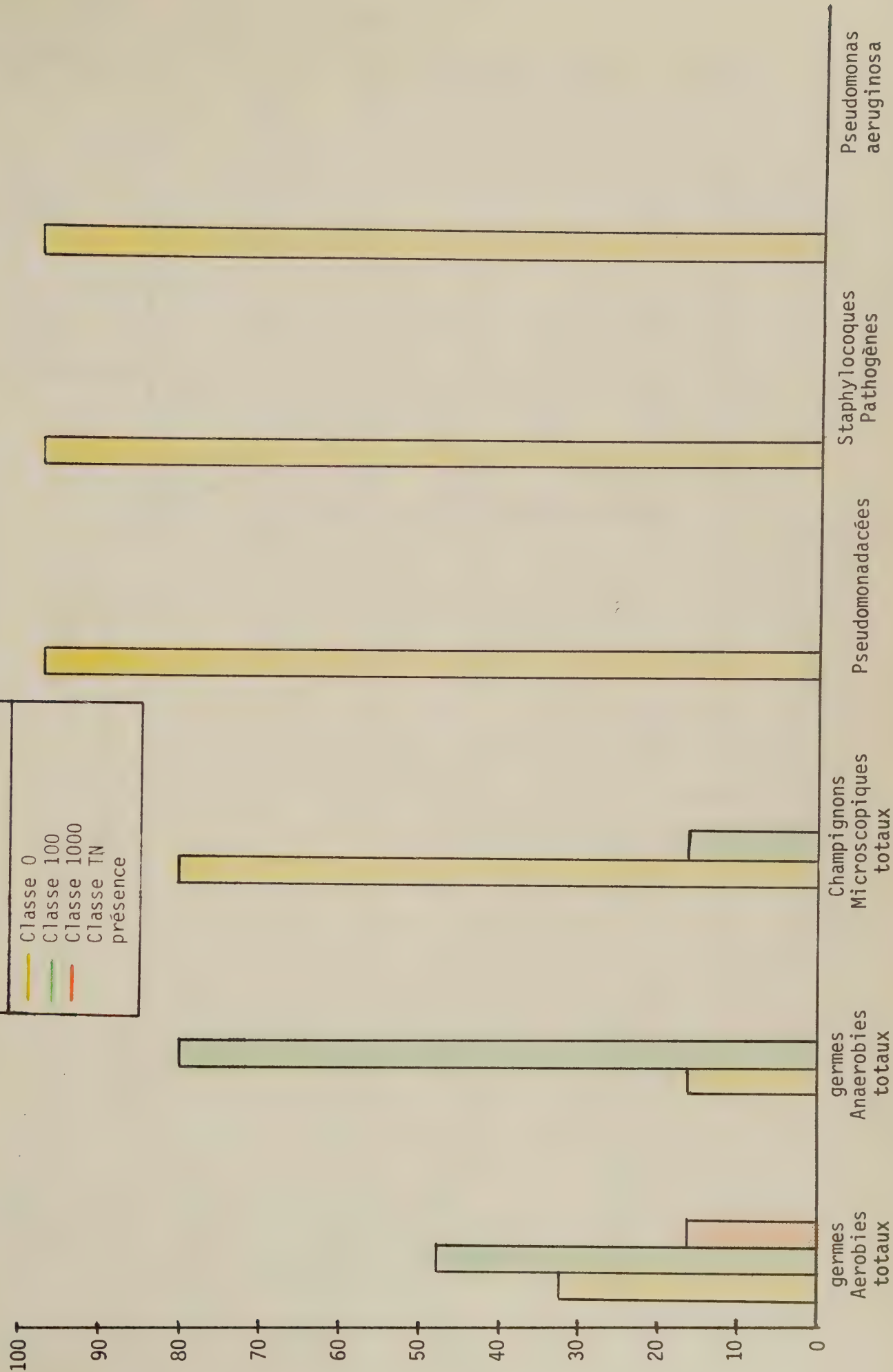
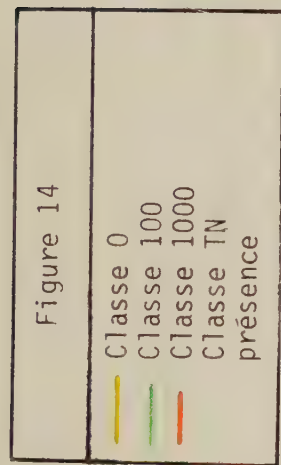


Tableau XXVI - GAIACOL et DERIVES

CLASSES →		0		100		1000		T.N.		Présence		NOMBRE DE SIROPS ↓			
GERMES, RECHERCHES		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%				
Aérobies totaux		3	5,45	37	67,30	7	12,70	8	14,55	52	94,55	55			
Anaérobies totaux		10	18,20	39	70,90	6	10,90			45	81,80	55			
Champignons microscopiques totaux		23	41,80	27	49,10	1	1,80	4	7,30	32	58,20	55			
Pseudomonadacées		53	96,40	2	3,60					2	3,60	55			
Absence		Présence		ESPECES PARTICULIERES								Absence		Présence	
Nbre	%	Nbre	%									Nbre	%	Nbre	%
55	100	0	0	→ STAPHYLOCOQUES PATHOGENES PSEUDOMONAS AERUGINOSA →								54	98,20	1	1,80

% échantillons de sirops

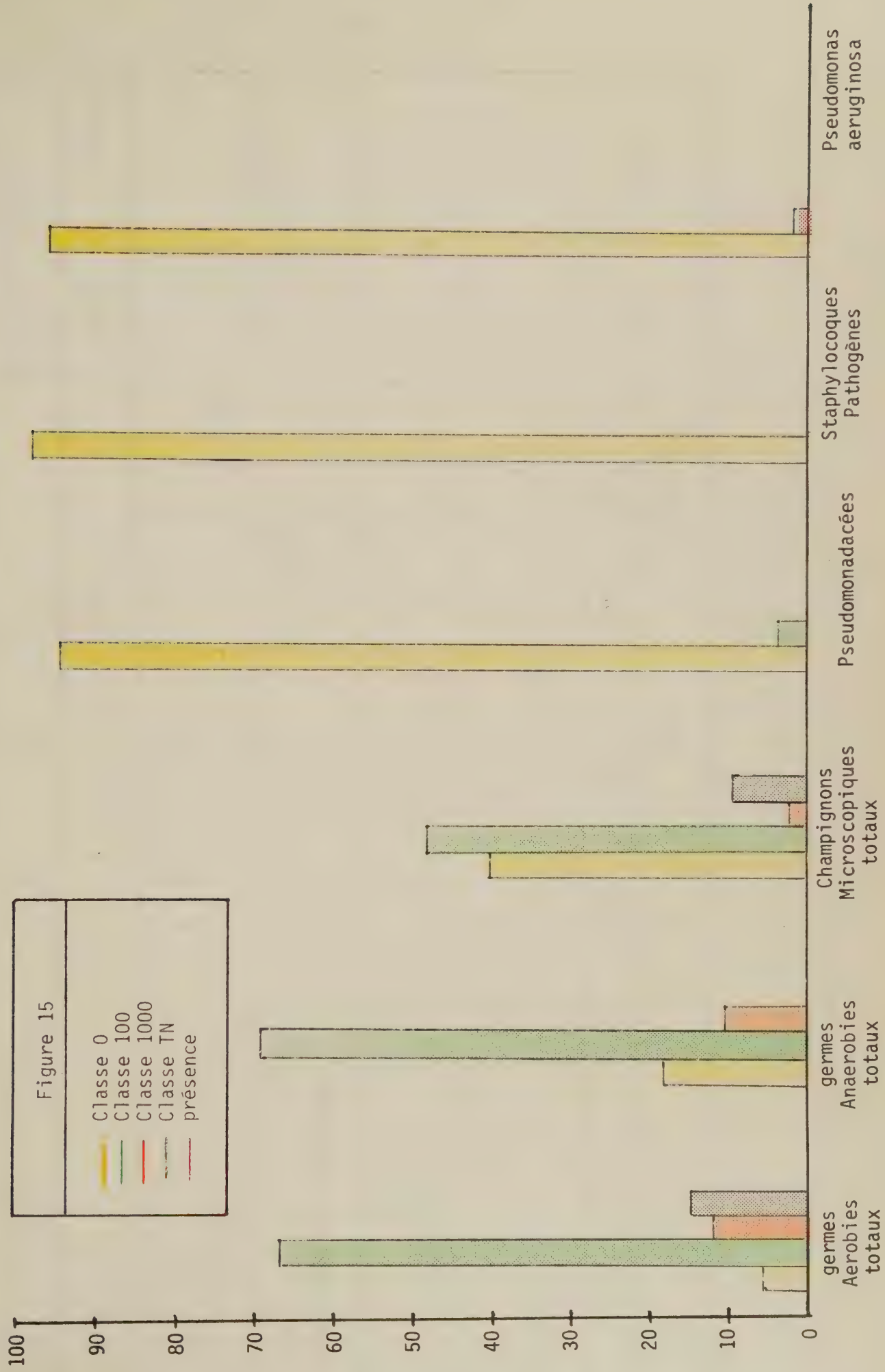
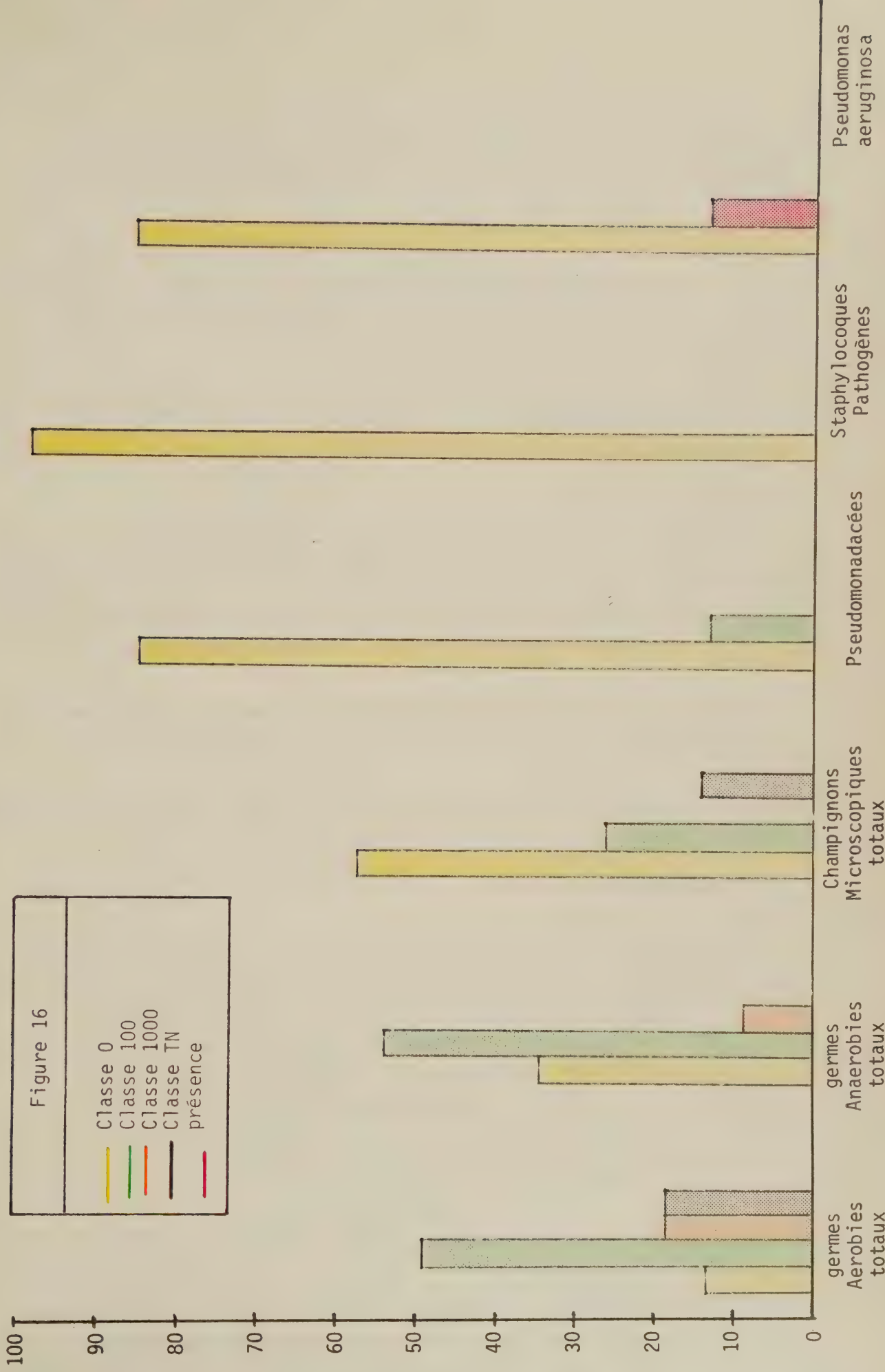


Tableau XXVII - PRINCIPALES HUILES ESSENTIELLES ET DERIVES

CLASSES →		0		100		1000		T.N.		Présence		NOMBRE DE SIROPS ↓			
Germes recherchés ↓		Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%	Nbre	%				
Aérobies totaux		3	13,60	11	50	4	18,20	4	18,20	19	86,40	22			
Anaérobies totaux		8	36,40	12	54,50	2	9,10			14	63,60	22			
Champignons microscopiques totaux		13	59,10	6	27,30			3	13,60	9	40,90	22			
Pseudomonadacées		19	86,40	3	13,60					3	13,60	22			
Absence		Présence		ESPECES PARTICULIERES								Absence		Présence	
Nbre	%	Nbre	%	← STAPHYLOCOQUES PATHOGENES				PSEUDOMONAS AERUGINOSA →				Nbre	%	Nbre	%
22	100	0	0									19	86,40	3	13,60

% échantillons de sirops



En réalité les influences que peuvent exercer le pH, la nature des conservateurs, la composition des sirops, ne peuvent à eux seuls suffire à rendre compte du degré de la contamination des échantillons analysés.

D'autres facteurs peuvent intervenir, dont le plus important est le respect des règles de propreté à observer tout au long d'une fabrication pharmaceutique.

Ceci montre aussi une fois de plus l'importance primordiale de ne tolérer au départ de la fabrication que le moins possible de germes contaminants.

Aussi, afin de retrouver les causes essentielles d'une pollution finale élevée d'un sirop, serait-il très utile de procéder à une enquête d'ordre microbiologique, qui mettrait à jour les *points faibles* des conditions de fabrication responsables de la contamination éventuelle.

A titre d'exemple et pour des raisons pratiques, nous avons choisi un sirop à base de calcium pour illustrer ce genre d'investigations.

6°) Modèle d'une enquête microbiologique concernant la fabrication d'un sirop

a) Procédé de fabrication

Résumée dans le schéma ci-joint (figure 17 page 141), la fabrication du sirop de calcium a été réalisée selon le protocole suivant :

- 1er jour : - début de fabrication du sirop,
 - refroidissement,
 - fin de fabrication,
- 2ème jour : - filtration,
 - stockage,
 - remplissage.

Il est important de signaler que le sirop dans la première cuve est chauffé à 100°C pendant 30 minutes. Cette opération réduit considérablement les contaminations pouvant provenir des matières premières.

En outre, après chaque préparation, tout le matériel a été très soigneusement nettoyé.

b) Contrôles effectués

Méthode employée

Prélevés en flacons stériles et dans les meilleures conditions d'asepsie possibles, les échantillons à analyser ont été dilués et passés à travers des membranes filtrantes selon la méthode décrite précédemment.

Chaque échantillon a été essayé sur les 4 milieux suivants :

- *gélose trypticase soja*, pour les germes aérobies totaux et anaérobies totaux,
- *gélose type Sabouraud glucosée* pour les champignons microscopiques totaux,
- *milieu d'enrichissement (E.E. BROTH) et de réensemencement (gélose au rouge violet, vert brillant et sels biliaires)* pour les entérobactériacées,
- *gélose Pseudosel* pour les Pseudomonadacées.

Points de contrôle

Différentes évaluations de la propreté microbiologique ont été effectuées à certains points sensibles du circuit de fabrication, ainsi que sur toutes les matières premières entrant dans la composition du sirop.

Les stades de contrôles ont été numérotés et sont constitués comme suit :

Matières premières

- 2 - Sucre
- 3 - Lactobionate de calcium
- 4 - Gluconate de calcium
- 5 - Acide benzoïque
- 7 - Extrait de curaçao
- 8 - Essence d'oranges douces
- 9 - Acide formique

Sirop aux divers stades de fabrication

- 6 - à la sortie de la cuve de 1000 litres après refroidissement (1er jour)
- 10 - avant filtration
- 10 bis - avant filtration (2ème jour)
- 11 - après filtration
- 12 - à la sortie de la cuve de stockage
- 15 - après remplissage

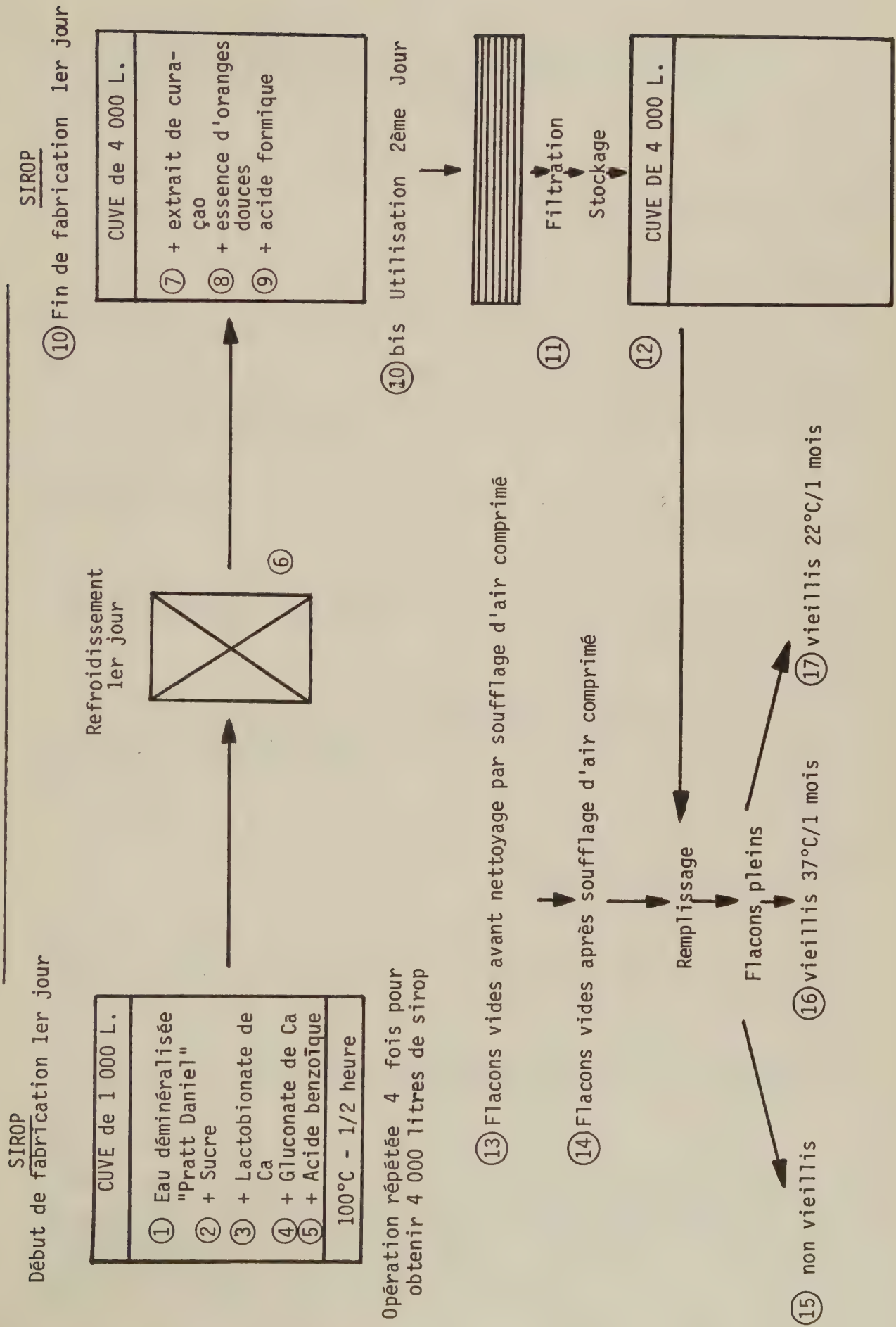
Sirop après conditionnement

- 16 - vieilli à 37°C pendant 1 mois
- 17 - vieilli à 22°C pendant 1 mois

Articles de conditionnement

- 13 - flacons vides avant nettoyage par soufflage d'air comprimé
- 14 - flacons vides après soufflage d'air comprimé

Figure 17 - SCHEMA DE FABRICATION D'UN SIROP A BASE DE CALCIUM



RESULTATS OBTENUS

Ils sont tous résumés dans le tableau ci-joint (tableau XXVIII pages 144 et 145). Ces résultats sont exprimés en nombre de colonies (X) au ml ou au g.

INTERPRETATION DES RESULTATS

- Matières premières

L'ensemble des matières premières est relativement propre du point de vue microbiologique, à l'exception de trois produits :

- l'eau déminéralisée : qui contient 300 aérobie/ml,
- le gluconate de calcium : avec une présence élevée d'aérobies et d'anaérobies,
- l'extrait de curacao : avec une très forte contamination par champignons microscopiques.

A signaler la très grande propreté microbiologique des acides benzoïque et formique et de l'essence d'oranges douces, ce qui était d'ailleurs prévisible, contrairement à la forte pollution de l'extrait de curacao.

- Articles de conditionnement

Un fait très intéressant est à signaler : les flacons vides nettoyés par soufflage d'air comprimé sont nettement plus pollués après soufflage.

- Sirop aux divers stades de fabrication et après conditionnement

A tous les points de contrôle, en cours de fabrication, il n'apparaît pas de pollution importante. Le sirop à la sortie de la cuve de 1000 litres, après refroidissement, est très propre, bien qu'on ait introduit des éléments qui le sont moins, comme l'eau déminéralisée et le gluconate de calcium. Ceci est dû vraisemblablement au chauffage à 100°C pendant 30 minutes.

Quant à la forte pollution de l'extrait de curaçao, elle semble atténuée par la présence d'acides benzoïque et formique, et peut-être même de *l'essence d'oranges douces*.

Le sirop contrôlé après remplissage et n'ayant pas subi d'épreuve de vieillissement artificiel n'est pas très propre au point de vue microbiologique. Peut-être cela est-il dû à l'emploi de flacons pollués par soufflage d'air comprimé non filtré. Par contre, après l'épreuve de vieillissement artificiel, les conservateurs et la pression osmotique du milieu agissent probablement : le degré de pollution diminue alors.

Dans l'ensemble donc, à tous les stades de fabrication contrôlés, les échantillons de sirops peuvent être considérés comme relativement peu contaminés.

o o o o o o o

Dans le cas de la fabrication étudiée, les améliorations suivantes peuvent être suggérées :

- il serait facile et efficace de nettoyer les flacons par soufflage d'air stérile (par passage à travers une membrane filtrante, par exemple),
- il est possible également d'exiger une haute qualité microbiologique pour l'eau déminéralisée et le gluconate de calcium.

o o o o o o o

Le sirop étudié ne présente donc apparemment pas une teneur élevée en micro-organismes, mais il est vraisemblablement possible de la ramener à un niveau encore inférieur en appliquant les quelques améliorations suggérées et surtout en exigeant des règles d'hygiène très strictes.

REMARQUE : Cette enquête a été pratiquée sur un seul cycle de fabrication, mais les différentes analyses mentionnées ont été pour la plupart effectuées plusieurs fois.

Une nouvelle fabrication industrielle du même sirop, ayant été réalisée en tenant compte des mesures préconisées ci-avant, une nouvelle analyse microbiologique de notre part a montré que celui-ci était nettement plus propre qu'auparavant.

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE D'UN SIROP A BASE DE CALCIUM

(non vieilli, après remplissage)

		Nombre de colonies/ml de germes	
Germes	Sirop	Avant l'application des mesures préconisées	Après l'application des mesures préconisées
Aérobies totaux		142	1
Anaérobies totaux		0	0
Champignons microscopiques totaux		9	1
Entérobactériacées		0	0
Pseudomonadacées		0	0

Tableau XXVIII - SIROP A BASE DE CALCIUM

Enquête microbiologique - Résultats obtenus

GERMES RECHERCHES →	AEROBIES TOTAUX	ANAEROBIES TOTAUX	CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES TOTAUX	ENTEROBACTERIACEES	PSEUDOMONADACEES
1 Eau déminéralisée "Pratt Daniel"	300/ml	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
2 Sucre	50/g	38/g	0/g	0/g	0/g
3 Lactobionate de calcium	2/g	0/g	1/g	0/g	0/g
4 Gluconate de calcium	620/g	340/g	4/g	0/g	20/g
5 Acide benzoïque	0/g	0/g	0/g	0/g	0/g
6 Sirop à la sortie de la cuve de 1000 l après refroidissement	10/ml	0/ml	2/ml	0/ml	0/ml
7 Extrait de curacao	40/ml	3/ml	très nombreuses	0/ml	1/ml
8 Essence d'oranges douces	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
9 Acide formique	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml

Tableau XXVIII - (suite) SIROP A BASE DE CALCIUM

Enquête microbiologique - Résultats obtenus

GERMES RECHERCHES →	AEROBIES TOTAUX	ANAEROBIES TOTAUX	CHAMPIGNONS MICROSCOPIQUES TOTAUX	ENTEROBACTERIACEES	PSEUDOMONADACEES
Sirop avant filtration (1er jour) 10	5/ml	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
Sirop avant filtration (2ème jour) 10bis	5/ml	2/ml	0/ml	0/ml	0/ml
Sirop après filtration 11	2/ml	0/ml	0/ml	0/ml	0/ml
Sirop à la sortie de la cuve de stockage 12	0/ml	1/ml	0/ml	0/ml	0/ml
Flacons vides avant nettoyage par souf- flage d'air comprimé 13	2/fl	7/fl	1/fl	0/fl	0/fl
Flacons vides après soufflage d'air comprimé 14	300/fl	0/fl	3/fl	0/fl	0/fl
Sirop après remplissa- ge non vieilli 15	142/ml	0/ml	9/ml	0/ml	0/ml
Sirop vieilli artifi- ciellement 1 mois à 37°C 16	8/ml	1/ml	0/ml	0/ml	0/ml
Sirop vieilli artifi- ciellement 1 mois à 22°C 17	2/ml	3/ml	0/ml	0/ml	1/ml

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Dans le domaine de la contamination microbienne des médicaments, il est impossible de dissocier méthodologie et résultats. Aussi avons-nous mis au point une méthode d'étude bien précise adaptée à chaque genre ou espèce de micro-organisme recherché.

L'analyse microbiologique de 200 sirops pharmaceutiques commercialisés en France, qui a été le sujet de notre travail, nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

a) Sur le plan qualitatif :

A partir de prises d'essais égales en moyenne à 5 ml, nous avons constaté que :

- 5,5 % des sirops ne sont contaminés par aucun germe,
- 92 % d'entre eux renferment des bactéries aérobies,
- 73,5 % contiennent des bactéries anaérobies,
- 36,5 % permettent la mise en évidence de champignons microscopiques,
- 9 % renferment des Pseudomonadacées, dont 4 % des *Pseudomonas aeruginosa*,
- 0,5 % d'entre eux enfin se sont montrés contaminés par des Staphylocoques pathogènes d'après les critères retenus,
- aucun ne renferme d'Entérobactériacées, de germes sulfito-réducteurs (*Clostridium perfringens*) ou de Streptocoques fécaux.

b) Sur le plan quantitatif :

Un certain pourcentage de sirops contient :

- moins de 100 micro-organismes au ml :

. germes aérobies totaux	: 72,5 %
. germes anaérobies totaux	: 65,5 %
. champignons microscopiques totaux	: 31,5 %
. Pseudomonadacées	: 8,5 %

- entre 100 et 1000 micro-organismes au ml :

. germes aérobies totaux	: 10,5 %
. germes anaérobies totaux	: 7 %
. champignons microscopiques totaux	: 0,5 %
. Pseudomonadacées	: 0,5 %

- plus de 1000 micro-organismes au ml :

. germes aérobies totaux	: 9 %
. germes anaérobies totaux	: 1 %
. champignons microscopiques totaux	: 4,5 %

Il ne faut pas négliger le fait que des germes pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, d'ailleurs rencontrés dans quelques échantillons, peuvent très bien survivre dans les sirops, puis se développer à nouveau à la faveur de conditions de croissance plus favorables et causer alors des troubles plus ou moins graves.

Ces résultats permettent donc de dire que dans leur grande majorité les sirops examinés dans la présente étude sont relativement propres du point de vue microbiologique ; ils ne renferment presque toujours que des micro-organismes saprophytes peu nombreux.

Il serait souhaitable d'adopter des recommandations et surtout des normes, dont les ordres de grandeur ont déjà été indiqués et qui, fixées officiellement devraient être respectées.

A la lumière des constations résultant de la présente étude, nous pensons qu'il serait judicieux d'adopter les mesures suivantes :

- *Application d'une surveillance de la propreté au cours de la fabrication*
 - surveillance et règles d'hygiène,
 - contrôle microbiologique à tous les niveaux, depuis les matières premières jusqu'au produit fini.
- *Normalisation des méthodes de recherche, de numération et d'identification, tant en ce qui concerne le matériel que les techniques, les milieux de culture, les temps et durées d'incubation, ...*
- *Adoption des normes de qualité suivantes pour 1 ml de sirop :*

- absence de germes potentiellement pathogènes revivifiables,
- taux relativement bas de germes saprophytes revivifiables, moins de 100,
- absence de germes témoins d'une mauvaise hygiène (Staphylocoques pathogènes, recherche des germes revivifiables de la flore fécale : *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Clostridium perfringens*, ...).

- *Epreuve complémentaire de vieillissement* (à la température ordinaire ou à 37°C), suivie d'un examen microbiologique, pouvant donner des indications intéressantes, les valeurs trouvées ne devant pas augmenter de façon significative d'un contrôle à l'autre.

Mais en réalité, les moyens les plus efficaces pour obtenir des sirops pharmaceutiques contenant le minimum de micro-organismes sont :

- d'une part, avoir le souci permanent de fabriquer dans des conditions de propreté optimale,
- d'autre part, maintenir à son degré le plus bas, le niveau de pollution microbienne éventuellement présent à la "*naissance*" du produit.

Cela implique que le pharmacien et ceux qui l'assistent au cours de la fabrication aient toujours présente à l'esprit cette notion de contamination bactérienne ou fongique.

En ce qui concerne les conservateurs, leur utilisation judicieuse (dont le dessein est de préserver les sirops d'une contamination postérieure à leur fabrication et non de masquer une pollution présente au départ) doit apporter une aide efficace. Cependant, un immense travail reste à faire dans ce domaine pour déterminer en particulier l'efficacité, la stabilité de chacun des divers produits susceptibles d'être utilisés.

Il est évident enfin que l'emploi d'un *conditionnement à doses unitaires* éviterait une éventuelle contamination en cours d'utilisation.

En conclusion, nous pouvons affirmer que les résultats obtenus au cours de notre travail sont dans l'ensemble encourageants. *Seul, un très faible pourcentage d'échantillons de sirops analysés ne répond pas aux normes assez sévères que nous suggérons.* Le respect plus strict de certaines règles élémentaires d'hygiène générale et de propreté au cours de la fabrication, un contrôle microbiologique des matières premières réalisé avant leur utilisation, l'emploi judicieux de conservateurs actifs et stables, permettraient vraisemblablement d'obtenir des sirops pharmaceutiques dont la contamination bactérienne ou fongique serait sinon nulle, tout au moins très faible.

BIBLIOGRAPHIE

B I B L I O G R A P H I E

- 1 AGLIFFE (G.A.), LOWBURY (J.L.), HAMILTON (J.) and Coll.
Hospital infection with Pseudomonas aeruginosa in neurosurgery
Lancet (1965) 2, 365
- 2 AJL (S.J.), REEDAL (J.S.), DURRUM (E.L.) and Coll.
Studies on plague. I. Purification and properties of the toxin of Pasteurella pestis
J. Bact. (1955) 70, 158-169
- 3 ALFORD (J.A.), WIESE (E.E.), GUNTER (J.J.)
Heat resistance in corynebacterium and the relationship of this genus to microbacterium
J. Bact. (1955) 69, 516-518
- 4 ANONYME
Ceskoslovensky Lecopis 2 vyd Czechoslovakian Pharmacopeia 2nd Ed. (1954)
- 5 ANONYME
Epidemiology. Infections diseases. Infections at Birmingham and Midlands Eye Hospital. Infections diseases and vital statistics.
Brit. Med. J. (1965) II, 1316
- 6 ANONYME
Filtres et appareillages
Catalogue MF - 68
Malakoff (France), Millipore S.A., 1968
- 7 ANONYME
The Merck Index. An Encyclopedia of chemicals and drugs. 8th Edition
Rahway (N.Y.), Merck and Co., Inc., 1968, 1713 p.
- 8 ANONYME
Méthodes d'analyse microbiologique des produits laitiers (beurre, fromages frais, yaourts, fromages fondus)
Ann. Nutr. Alim. (1969) 23, A 1 - A 88
- 9 ANONYME
Normes pour les substances biologiques
Série : Rapports Techniques n° 200
Genève, O.M.S., 1960
- 10 ANONYME
Salmonellosis associated with carmine dye, Epidemiological notes and reports. Reported by the Salmonella Unit, Bacteriology Section, Epidemiology Branch C.D. Morbidity and Mortality (U.S. Dept. Health, Education and Welfare) (1966) 15, 415

- 11 ANONYME
Spécifications pour le contrôle de la qualité des préparations pharmaceutiques
Pharmacopée Internationale, 2e Edition
Genève, O.M.S., 1967, 950 p.
- 12 ATOLIK (P.), HUDEC (J.)
Persistance de la contamination microbienne dans les excipients pour pommade
Ceskosl. Farm. (1966) 15, n° 3, 146-147
- 13 BARBER (M.)
Hospital infection yesterday and today
J. Clin. Pathol. (1961) 14, 2-10
- 14 BARBEROT (R.), PINZON (R.), MIRIMANOFF (A.)
Contribution à l'étude d'un test de contrôle microbiologique de la conservation de certaines formes galéniques (sirops, gouttes, onguents) 1ère communication
Pharm. Acta Helv. (1964) 39, 556-573
- 15 BAUER (M.F.), COHEN (H.)
The role of Pseudomonas aeruginosa in infections about the nails
Arch. Dermatol. (1957) 75, 394
- 16 BEAN (H.S.)
La préservation des produits pharmaceutiques contre la contamination microbienne
Ann. Pharm. Fr. (1967) 25, n°4, 265-270
- 17 BEAN (H.S.)
The microbiology of topical preparations in pharmaceutical practice. 2. Pharmaceutical aspects
Pharm. J. (GB) (1967) 199, 289-292
- 18 BEAN (H.S.), BECKETT (AM.M.), CARLESS (J.E.)
Advances in Pharmaceutical Sciences, Vol. I
London, Academic Press I, 1964, 334 p.
- 19 BEERENS (H.), CATSARAS (M.), TAHON (M.M.)
Recherche des coagulase, phosphatase et Dn ase chez les staphylocoques
Ann. Inst. Pasteur, Lille (1967) XVIII, 129-132
- 20 BENTZON (W.)
Normes pour les substances biologiques
Document O.M.S. n° 200 Genève (inédit) (1959)
- 21 BESSON (J.), DESBORDES (J. et Coll.)
Contribution à l'étude bactériologique de l'air à Paris
Ann. Inst. Pasteur, Paris 522, (1955), 89-514
- 22 BEYS-L'HOEST (B.)
La recherche des staphylocoques dans les aliments, les produits diététiques et les médicaments à usage oral
J. Pharm. Belg. (1970) 25, n° 1, 26-56

- 23 BLAUG (S.M.), AHSAN (S.S.)
Interaction of sorbic acid with nonionic macromolecules
J. Pharm. Sci. (1961) 50, 138
- 24 BOEHM (E.)
Conservation des produits cosmétiques
Parfum. Mod. (1933) 27, 373-383
- 25 BOEHM (E.), JONES (E.)
Nipaester combinations as preservatives and antiseptics
Soc. Cosmet. Chemists (1957) 8, 30-40
- 26 BOLLE (A.), MIRIMANOFF (A.)
Antagonism between nonionic detergents and antiseptics
J. Pharm. Pharmacol. (1950) 2, 685-692
- 27 BOWMAN (W.F.)
Microbial contamination of antibiotic ophtalmic ointements
J. Pharm. Sci. (1969) 58, n° 2, 277-278
- 28 BRIGGS (A.), COOK (A.M.)
2nd Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists
Oxford, Pergamon Press, 1962
- 29 BROWN (E.H.)
Therapeutic experiences with corneal ulcer due to bacillus pyocyaneus
Arch. Ophthalmol. (1943) 30, 221-224
- 30 BROWN (M.R.), FOSTER (J.M.), NORTON (D.A.) and Coll.
Infections diseases. Infections at Birmingham and Midlands Eye Hospital
Infections diseases and vital statistics
Pharm. J. (1964) 192, 8
Brit. Med. J. (1965) 11, 1316
- 31 BROWNE (C.A.)
The determination of raw cane sugar : a problem in food conservation
J. Indust. Engng. Chem. (1918) 10, 178
- 32 BÜHLMANN (X.)
Method for microbiological testing of nonsterile pharmaceuticals
Appl. Microbiol. (1968) 16, n° 12, 1919-1923
- 33 BUTTIAUX (R.), MOSSEL (D.A.A.)
La colimétrie de l'eau sur membranes filtrantes
Ann. Inst. Pasteur, Lille (1957) 9, 138-175
- 34 BUTTIAUX (R.), BROGNIART (B.)
Milieu d'enrichissement des staphylocoques
Ann. Inst. Pasteur, Lille (1947) 73, 830

- 35 CHAPMAN (G.H.)
The signification of sodium chloride in studies of staphylococci
J. Bact. (1945) 50, 201-203
- 36 CHERNOSKY (M.E.), DUKES (C.D.)
Green nails. Importance of Pseudomonas aeruginosa in onychia
Arch. Dermatol. (1963) 88, 548
- 37 DAVIS (J.G.)
Chemical sterilization
J. Pharm. Pharmacol., suppl. (1960) 12, 29 T- 40 T
- 38 DESBORDES (J.), NINARD (B.)
Considérations sur le problème du contrôle de "non contamination" ou de "stérilité" des médicaments injectables (y compris les produits d'origine sanguine) de ceux applicables sur les muqueuses et du matériel chirurgical ou destiné aux perfusions, transfusions, inoculations
Boll. Chim. Farm. (1962) 101, 415-461
- 39 DEVILLERS (P.)
Premières études microbiologiques en sucrerie
Indust. Agric. Aliment. (1949) 66, 323-328
- 40 DEVILLERS (P.)
Analyse bactériologique des sucres et sirops
Mises au point de chimie analytique pure et appliquée et d'analyse bromatologique 8e Série
Paris, Masson et Cie, 1960, 57-75
- 41 DONY (J.)
La condition microbiologique du médicament non stérilisé
Mémoire présenté aux Journées Pharmaceutiques Françaises de Paris (Mars 1969)
- 42 DONY (J.)
Condition microbiologique du médicament non stérile
Le Moniteur des Pharmacies et des Laboratoires (1969) 23, n° 875, 791
- 43 DONY (J.), GERARD (P.)
La contamination microbienne des médicaments et l'établissement de normes de qualité bactériologique
J. Mond. Pharm. (1968) 11, n° 1, 19-30
- 44 DUCHENNE (J.)
Contrôle bactériologique des laits médicamenteux, leur nombre de germes
Journées Pharmaceutiques Françaises, Paris 1957
- 45 EVANS (D.G.), MILES (A.A.), NIVEN (J.S.F.)
The enhancement of bacterial infections by adrenaline
Brit. J. Exp. Pathol. (1948) 20, 20-39

- 46 EWING (E.)
Identification of enterobacteriaceae
Minneapolis (Minn.), Burgess Publ. Co., 1962
- 47 EWING (E.)
Enterobacteriaceae
U.S.P.H.S. Publication n° 734, Washington, 1960
- 48 FATTORUSSO (V.), RITTER (O.)
Dictionnaire de pharmacologie classique à l'usage du médecin, du pharmacien et de l'étudiant
Paris, Masson et Cie, 1967, 829 p.
- 49 FORKNER (C.E.), FREI (E.), EDYCOMB (J.H.) and Coll.
Pseudomonas septicemia. Observations on twenty three cases
Am. J. Med. (1958) 25, 877
- 50 FRAENKEL (E.Z.)
Weitere Untersuchungen über die Menschenpathogenität des Bacillus pyocyaneus
Z. Hyg. Infektionskrh. (1917) 84, 369-424
- 51 FRANCKE (D.E.)
Production hygiene and microbiological contamination in pharmaceutical preparations
Drug Intel. (1968) 2, 29
- 52 GAINES (S.), LANDY (M.)
Prevalence of antibody to Pseudomonas in normal human sera
J. Bact. (1955) 69, 628-633
- 53 GASTINEL (P.)
Précis de bactériologie médicale, 2e édition
Paris, Masson et Cie, 1957, 1237 p.
- 54 HESS (H.), KNÜSEL (F.), MULLEN (K.)
Control of low level microbial contamination of drug preparations
Pharm. Act. Helv. (1969) 44, n° 3, 174-191
- 55 HIRSCH (J.I.), CANADA (A.T.), RANDALL (E.L.)
Microbial contamination of oral liquid medications
Am. J. Hosp. Pharm. (1969) 26, 625-629
- 56 HUGO (W.G.), FOSTER (J.M.S.)
Growth of Pseudomonas aeruginosa in solutions of esters of p-hydroxybenzoic acid
J. Pharm. Pharmacol. (1964) 16, 209
- 57 HUISMAN (J.), DANIELS-BOSMAN (M.S.)
Salmonella contamination of an organ preparation (pancreatin)
Nederl. T. Geneesk (1962) 106, 371

- 58 JAMINET (Fr.)
Agents conservateurs et paramètres déterminant leur efficacité
Cercle Scientifique des anciens élèves de l'Institut Gilkinet (A.)
Liège, Journée Scientifique du 16/3/1969
- 59 KALLINGS(L.O.)
Good manufacturing procedures and microbiological control for non-sterile drugs
SIM Special Publication n° 4
Proceedings of the Society for Industrial Microbiology, Summer Institute,
19 - 27 may 1968
University of Maryland, College Park, Maryland 20 742 (sous presse)
- 60 KALLINGS(L.O.), ERNFELDT (F.), SILVERSTOLPE (L.)
Microbiological contamination of medical preparations
Report 1965 to the Swedish National Board of Health (voir aussi Acta Path.
Microbiol. Scand. 1966, 66, 287)
- 61 KALLINGS(L.O.), RINGERTZ (O.), SILVERSTOLPE (L.) and Coll.
Microbiological contamination of medical preparations
Acta Pharm. Suecica (1966) 3, 219-228
- 62 KELLY (C.D.), LAYNE (S.)
Bacteria found in the air over the Canada and American Arctic
Bacteria found in the air over the Atlantic Ocean
Canad. J. Microbiol. (1957) 3, 447,457
- 63 KIGER (J.L.) et Coll.
Matériel et moyens de prélèvement et d'homogénéisation des matières premières en vue de leur contrôle analytique
Pharm. Industr., (Fr) (1967) n° 80, 3-30
- 64 KIGER (J.L.), AZRIA (M.)
Dispositif de contrôle de la stérilité des solutés injectables en ampoules de faible volume à l'aide des membranes filtrantes
Ann. Pharm. fr. (1968) 26, n° 5, 351-357
- 65 KIGER (J.L.), KIGER (J.G.)
Techniques modernes de la biscuiterie, pâtisserie - Boulangerie industrielle et artisanale et des produits de régimes, Tome 2
Paris, Dunod Ed., 1968, 595 p.
- 66 KNUDSEN (L.F.)
Sample size of parenteral solutions for sterility testing
J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed. (1949) 38, 332-337
- 67 KNUSEL (F.), HESS (H.), LIM (W.)
The problem of microbial contamination of drug preparations
Mémoire présenté à la 9ème réunion de la Société Européenne pour l'Etude de la toxicité des médicaments
Oxford, 8 - 10 avril 1968

- 68 KOVACS (N.)
Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction
Nature (1956) 178, n° 4535, 703
- 69 LAGRANGE (E.), LAGRANGE (M.T.)
Sur la diversité d'action de la lanoline et du tapioca sur quelques germes pathogènes
CR Soc. Biol. (1935) 120, 390-1
- 70 LAMBIN (S.), BERNARD (J.)
Etude de certaines conditions du contrôle de stérilité
Ann. Pharm. Fr. (1966) 24, n° 9-10, 573-586
- 71 LAMBIN (S.), GERMAN (A.)
Précis de Microbiologie I
Paris, Masson et Cie, 1961, 458 p.
- 72 LEBEAU (P.), JANOT (M.M.)
Traité de pharmacie chimique
Tome III : Chimie organique
Paris, Masson et Cie, 1955-56, 1199 p.
- 73 LEHRFELD (L.), DONNELLY (E.J.)
Contaminated ophthalmic ointments
Am. J. Ophtal. (1948) 31, 470-475
- 74 LENNINGTON (K.R.)
Microbiological control of drugs
What is being done and what must be done to keep drugs and related products free of harmful microorganisms
F.D.A. Papers (1969) 3, n° 1, 10-16
- 75 LENNINGTON (K.R.)
Salmonella in drugs and dietary supplements
Drug Cosmet. Indust. (1967) 100, 174-175
- 76 LYSENKO (O.)
Pseudomonas - an attempt at a general classification
J. Gen. Microbiol. (1961) 25, 379-408
- 77 MAISONNET (A.)
Les germes de l'air. "L'Hydroaéroscope", nouvel appareil permettant l'étude de la pollution atmosphérique
Rev. Hyg. Med. Soc. (1956) 4, 228-240
- 78 MAISONNET (A.)
Etude bactériologique de l'air marin au large de la côte africaine
Rev. Hyg. Med. Soc. (1959) 7, 62-70

- 79 McCULLOUGH (N.B.)
Laboratory tests in the diagnosis of Brucellosis
Amer. J. Public Health (1949) 39, 866-869
- 80 McKENZIE (A.W.), STOUGHTON (R.B.)
Method for comparing percutaneous absorption of steroids
Arch. Dermatol. (1962) 86, 608
- 81 MEYER (H.)
Ergebnisse der Prüfung von flüssigen Arzneizubereitungen aus Apotheken auf ihren Mikroorganismenbefall
Pharm. Praxis (Beilage, Die Pharmazie) (1964) 5, 93-95
- 82 MILLET (M.), DONY (J.), GERARD (P.)
Problèmes posés par la présence de germes dans les médicaments non injectables
J. Pharm. Belg. (1965) 20, n° 11-12, 467-473
- 83 MITCHELL (R.G.), HAYWARD (A.C.)
Postoperative urinary tracts infections caused by contaminated irrigating fluid
Lancet (1966) 1, 793
- 84 MØLLER (Vagn.)
Simplified tests for some amino acid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system
Acta Path. Microbiol. Scand. (1955) 36, 158-172
- 85 MOORE (B.), FROMAN (A.)
An outbreak of urinary Pseudomonas aeruginosa infection acquired during urological operations
Lancet (1966) II, 929
- 86 MOSSEL (D.A.A.), VISSER (M.), CORNELISSEN (A.M.R.)
The examination of foods for enterobacteriaceae using a test of the type generally adopted for the detection of Salmonellae
J. Appl. Bacteriol. (1963) 26, n° 3, 444-452
- 87 NOBLE (W.C.)
Communication personnelle (1966)
- 88 NOBLE (W.C.), SAVIN (J.A.)
Steroid cream contaminated with Pseudomonas aeruginosa
Lancet (1966) 1, 347-349
- 89 PAYNE (A.M.M.)
Influence of humidity on survival of bacterium coli on skin
Month. Bull. Min. Health (1949) 8, 263-271
- 90 PEDERSEN (E.A.), ULRICH (K.)
Microbial content in non-sterile pharmaceuticals III. Raw materials
Dansk T. Farm. (1968) 42, 71-83

- 91 PHILLIPE (J.B.)
Modalités d'emploi des antiseptiques et désinfectants dans l'industrie pharmaceutique
Colloque sur les Antiseptiques et les Désinfectants, Paris, 27 - 29 mai 1964
- 92 PHILLIPS (J.)
Postoperative respiratory tract infection with Pseudomonas aeruginosa, due to contaminated Lignocaine jelly
Lancet (1966) 1, 903
- 93 POISSON (J.)
Recherche de la contamination bactériologique, Mises au point de chimie analytique organique, pharmaceutique et bromatologique 15e Série
Paris, Masson et Cie, 1967, 127-148
- 94 POISSON (J.), GUILBOT (A.)
Microflore des farines françaises, composition et évolution
Ann. Techn. J.N.R.A. (1957) 1, 63-85
- 95 REBELL (G.), PILLSBURY (D.M.), DE SAINT PHALLE (M.) and Coll.
Factors affecting the rapide disappearance of bacteria placed on the normal skin
J. Invest. Dermatol. (1950) 14, 247-264
- 96 REBUCK (J.W.), MELLINGER (R.C.)
Interruption by topical cortisone of leukocytic cycles in acute inflammation in man
Ann. N.Y. Acad. Sci. (1953) 56, 715-732
- 97 RINGEN (L.M.), DRAKE (Ch. H.)
A study of the incidence of Pseudomonas aeruginosa from various natural sources
J. Bact. (1952) 64, 841-845
- 98 ROHDE (P.A.) and Coll.
B.B.L. manual of products and laboratory procedures, 5th edition
Cockeysville (Maryland, USA), Baltimore Biological Laboratory, 1968, 211 p.
- 99 ROSENBLUTH (S.A.), GRIPPS (G.W.)
Inhibitory effects of detergents in membrane filters
Journ. Pharm. Sci. (1969) 58, n° 2, 440-442
- 100 SABOURAUD (R.)
Sur la parasitologie de l'éléphantiasis nostras
In : Annales de dermatologie et de syphiligraphie (1892) III, 592-600
- 101 SABOURAUD (R.)
Recherches sur la pathologie de l'éléphantiasis nostras
In : Annales de dermatologie et de syphiligraphie (1892) III, 629-630

- 102 SABOURAUD (R.)
Sur les cheveux moniliformes (trichorrexies et monilethrix)
In : Annales de dermatologie et de syphiligraphie (1892) III, 781-793
- 103 SABOURAUD (R.)
Contribution à l'étude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bactériologique sur la pluralité des trichophyton de l'homme
In : Annales de dermatologie et de syphiligraphie (1892) III, 1061-1087
- 104 SAND (F.)
Les facteurs de stabilité biologique des produits cosmétiques : leur importance et leur contrôle (1ère partie)
Parf. Cosm. Sav. (1968) n° 7, 309-317
- 105 SAND (F.)
Les facteurs de stabilité biologique des produits cosmétiques : leur importance et leur contrôle (2e partie)
Parf. Cosm. Sav. (1968) n° 8, 336-344
- 106 SAINT MARTIN (L.)
Une valve doseuse est née
Labo. Pharma. (1969) n° 181, 69-72, oct.
- 107 SAUNDERS (W.H.), RAY (J.W.)
Preoperative preparation of ear canal
Arch. Otolaryng. (1965) 81, 564-69
- 108 SAVIN (J.A.)
The microbiology of topical preparations in pharmaceutical practice
I. Clinical aspects
Pharm. J., GB (1967) 199, 285-288
- 109 SAWYER (C.N.), RYCKMAN (D.W.)
Anionic synthetic detergents and water supply problems
J. Amer. Wat. Wks Ass. (1957) 49, 480-490
- 110 SCHELIN (R.R.)
Drug metabolism by intestinal microorganisms
J. Pharm. Sci. (1968) 57, n° 12, 2021-2037
- 111 SCHILLER (I.), KUNTSCHER (H.), WOLFF (A.) and Coll.
Microbial content of nonsteril therapeutic agents containing natural or seminata active ingredients
Appl. Microbiol. (1968) 16, n° 12, 1924-28
- 112 SCHOTHORST (M. van), MOSSEL (D.A.A.), KAMPELMACHER (E.M.) and Coll.
The estimation of the hygienic quality of feed components using an Enterobacteriaceae enrichment test
Zbl. Veterinärmed. Reihe B (1966) 13, 273-285

- 113 SEKULES (G.), MARAGLIANO (E.)
La sterilità dei prodotti farmaceutici non iniettabili
Boll Chim. Farm. (1969) 108, 273-291
- 114 SELWYN (S.), CHALMERS (D.)
Dispersal of bacteria from skin : lesions, a hospital hazard
Brit J. Derm. (1965) 77, 349
- 115 SEMPE (M. Ph.)
La conservation des médicaments. Nouveaux conservateurs autorisés
Lyon Pharm. (1961) 12, 457-487
- 116 SHEHADEH (N.H.), KLIGMAN (A.M.)
The effect of topical antibacterial agents on the bacterial flora of the axilla
J. Invest. Dermatol. (1963) 40, 61
- 117 SHOOTER (R.A.), WALKER (K.A.), WILLIAMS (V.R.) and Coll.
Faecal carriage of Pseudomonas aeruginosa in hospital patients
Possible spread from patient to patient
Lancet (1966) 2, 1331
- 118 SHOREY (E.C.)
The determination of raw cane sugar in transit or storage
J. Soc. Chem. Indust. (1898) 17, 55-559
- 119 SOKOLSKI (W.T.), CHIDESTER (C.G.), HONEYWELL (G.E.)
Developments in Industrial Microbiology. Vol. III
New York, Plenum Press, 1962, 179-187
- 120 SOKOLSKI (W.T.), LUMMIS (N.E.)
The effect of salts on the movement and zone shape of neomycin and streptomycin in paperchromatography
Antibiot. Chemotherap. (1961) 11, 271
- 121 SPICHER (G.)
Die Ermittlung des Keimgehaltes von Getreide und Getreideprodukten und ihre Problematik
Brot u. Gebäck (1962) 16, n° 7, 124-134
- 122 STANLEY (Malcolm M.)
Bacillus pyocyaneus infectious. A review, report of cases and discussion of newer therapy including streptomycin
Amer. J. Med. (1947) 2, 253-277
- 123 SULITZEANU (D.)
Passive protection experiments with Brucella antisera
J. Hyg. (GB) (1955) 53, 133-142

- 124 SYKES (G.)
The basis for "sufficient of a suitable bacteriostatic" in injections
Journ. Pharm. Pharmacol. (1958) 10, 40 T - 46 T
- 125 TANNER (F.W.)
Microbiology of foods. 2nd edition
Illinois, Garrad Press, 1944, 1196 p.
- 126 UEHLEKE (H.)
Germ counting and determination of decaying processes with the aid of membrane filters. II On the problem of chemical reactivation of damaged microorganisms
Zbl. F. Bakt. (1960) 178, 91
- 127 VOGEL (R.A.), JOHNSON (M.)
Public Health Lab. (1960) 18, 131
- 128 WALLHÄUSSER (K.H.), SCHMIDT (H.)
Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie, Verfahren Wirkstoffe, Prüfungsmethoden
Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1967, 562 p.
- 129 WATT (P.J.), OKUBADEJO (O.A.)
Changes in incidence and aetiology of bacteraemia arising in hospital practice
Br. Med. J. (1967) 1, 210
- 130 WEDDERBURN (D.L.)
Preservation of toilet preparations containing nonionics
J. Soc. Cosmet. Chemists (1958) 9, 210-228
- 131 WHALLEY (de, H.C.S.), SCARR (M.P.)
Microorganism in raw and refined sugar and intermediate products
Chemistry and Industry (1947) 30
- 132 WHITE (M.), BOWMAN (F.W.), KIRSHBAUM (A.)
Bacterial contamination in some nonsterile antibiotic drugs
J. Pharm. Sci. (1968) 57, n° 6, 1061-1062
- 133 ZEBOVITZ (E.), EVANS (J.B.), NIVEN (C.F.)
Tellurite - Glycine agar : a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase positive staphylococci
J. Bact. (1955) 70, 687-690

